

Relatório Final de Estágio

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**PATOLOGIA RENAL EM ANIMAIS DE COMPANHIA – ALTERAÇÕES
MACROSCÓPICAS E HISTOPATOLÓGICAS
ESTUDO IMUNOHISTOQUÍMICO DO RECEPTOR NOTCH1 EM
TUMORES MAMÁRIOS CANINOS**

Ana Luísa Martino Costa

Orientador(es)

Prof. Doutora Patrícia Carla Araújo de Faria Dias Pereira

Co-Orientador(es)

Doutora Ana Maria Canadas Pereira de Sousa

Porto 2016

Relatório Final de Estágio

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**PATOLOGIA RENAL EM ANIMAIS DE COMPANHIA – ALTERAÇÕES
MACROSCÓPICAS E HISTOPATOLÓGICAS
ESTUDO IMUNOHISTOQUÍMICO DO RECEPTOR NOTCH1 EM
TUMORES MAMÁRIOS CANINOS**

Ana Luísa Martino Costa

Orientador(es)

Prof. Doutora Patrícia Carla Araújo de Faria Dias Pereira

Co-Orientador(es)

Doutora Ana Maria Canadas Pereira de Sousa

Porto 2016

Resumo

Um dos objectivos do presente estágio consistiu na participação nas necrópsias realizadas no âmbito das aulas práticas de Anatomia Patológica I, na recolha de material para exames histopatológicos e observação histológica do mesmo. Ao longo destas aulas verificou-se um grande número de casos de animais com alterações renais, pelo que a primeira vertente deste relatório consiste na descrição de todas as alterações renais macroscópicas e histológicas observadas, acompanhadas por uma breve revisão bibliográfica sobre os diferentes achados. A observação destas alterações permitiu concluir que animais sem sintomatologia nem história clínica de doença renal podem já apresentar alterações renais macroscópicas e histológicas, pelo que é benéfico a realização de rastreios clínicos para prevenção da patologia renal, principalmente em animais geriátricos.

Na segunda parte do estágio foi realizado um trabalho de investigação sobre a expressão imunohistoquímica do receptor Notch1 em tecido mamário de cadelas. O receptor Notch1 pertence a uma família de receptores transmembranares que desempenham um papel determinante na morfogénese, proliferação e diferenciação celular. Diversos estudos relatam o papel do receptor Notch1 na neoplasia de mama na mulher, ratinhos e na gata, e demonstram que a sua expressão está normalmente associada a tumores com comportamento biológico agressivo. Este estudo teve como objectivo a avaliação da expressão imunohistoquímica do receptor Notch1 em carcinomas simples de cadela e a avaliação da sua associação com o tipo e grau histológico das neoplasias.

Observou-se marcação sistemática da mama normal em mais de 75% das células epiteliais luminais com elevada intensidade. No grupo de carcinomas verificou-se marcação de 75% ou menos das células epiteliais luminais em 9 casos e nos restantes 30 marcação de mais de 75% das células. Não se verificou marcação do mioepitélio em nenhum dos casos. Foi observada marcação citoplasmática em todas as amostras de mama normal e em todas amostras de carcinomas simples, no entanto verificou-se reforço membranar apical em 16 carcinomas, dentro dos quais 14 correspondiam a carcinomas pouco diferenciados. Foi detectada uma associação estatisticamente significativa entre o grau histológico dos carcinomas e o grau de marcação dos para o receptor Notch1, tendo-se também verificado uma tendência para tumores de elevado grau histológico e elevado pleomorfismo nuclear apresentarem marcação de mais de 75% das células epiteliais luminais.

Agradecimentos

À Professora Patrícia Dias Pereira, por me ter acompanhado ao longo de todo o ano lectivo, por me ter incutido o gosto pela Patologia Veterinária e por todos os ensinamentos que me transmitiu. Considero-a um grande exemplo profissional mas também pessoal. Obrigada pela disponibilidade, paciência, confiança e por toda a ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

À Doutora Ana Canadas, pela simpatia com que me recebeu desde logo, por todos os serões passados no microscópio, pelas correcções das minhas ainda humildes descrições histológicas e paciência nas sessões de macroscopia. Por me ter deixado à vontade no laboratório de Patologia, e ter confiança nas minhas capacidades. Por estar sempre disponível para as minhas dúvidas, pelo apoio constante, e por todos os ensinamentos de vida que me transmitiu. Por ser uma patologista exemplar com gosto pelo seu trabalho.

À Professora Graça Lopes, pela simpatia com que me recebeu e me auxiliou na verificação e discussão dos dados estatísticos.

À equipa técnica do Laboratório de Patologia Veterinária.

À minha família, pelos valores que me incutiram, pelo apoio incondicional e por serem o meu porto seguro.

Ao CICBAS, por todos os momentos de descontração, por todos os momentos musicais, viagens e todas as memórias. Em especial, à minha família coralina, Helena, Catarina e Inês, por terem partilhado este percurso comigo e por o terem tornado numa das melhores fases da minha vida.

À Joana, por ter batalhado ao meu lado desde o primeiro dia, pelas sessões loucas de estudo, pelo amor comum pelos gatos, pelos passeios e férias, pela comida vegetariana deliciosa, por ser uma ovelha negra que não segue o rebanho. Obrigada pela tua amizade.

Ao Tiago, por ser um apoio constante na minha vida, por estar sempre lá e acreditar em mim nos meus momentos de fraqueza e por me fazer feliz.

Ao Bolinhas, Tico, Malhadão, Malhadinhas, Pretinha, Velhota, Ninja, Roxy e Mozart, por terem passado pela minha vida. À Milu e à Milady, que apesar de destruírem os meus bens pessoais não consigo deixar de gostar delas.

A todos os animais, independentemente da espécie, porque eles são a razão do nosso trabalho.

Lista de Abreviaturas

APES: 3-aminopropyltriethoxysilane

BSA: Bovine sérum albumine

DSL: Delta e JAG/Serrate

EDTA: Etilenodiamidatetracética

HE: Hematoxilina e Eosina

IRIS: International Renal Interest Society

NICD: Notch intracelular domain

OMS: Organização Mundial de Saúde

OVH: Ovariohisterectomia

PAS: Periodic Acid Shiff (Ácido Periódico de Shiff)

TBS: Tris-buffered saline solution

TM: Tricrómio de Masson

TMC: Tumores Mamários Caninos

WSAVA-RSSG: World Small Animal Veterinary Association Study Group

Índice

Resumo	iii
Agradecimentos	iv
Lista de Abreviaturas	v
Patologia Renal em Animais de Companhia – Alterações Macroscópicas e Histopatológicas	1
Casuística das Necrópsicas das Aulas de Anatomia Patológica I	1
Achados Patológicos do Aparelho Urinário	1
1. Achados Macroscópicos	2
2. Alterações Histopatológicas	2
2.1 Doença Glomerular	4
2.2 Quistos renais e doença glomeruloquística	6
2.3 Nefrite Intersticial	6
2.4 Fibrose Tubulointersticial	7
2.5 Amiloidose	8
2.6 Necrose da Crista Medular	9
2.7 Cilindrúria	9
2.8 Cristalúria	10
2.9 Mineralização Renal	11
2.10 Alterações Tubulares	11
2.11 Enfarte Renal	13
2.12 Lípidos Intersticiais	14
Estudo da Expressão Imunohistoquímica do Receptor Notch1 em Tumores Mamários Caninos ...	15
Introdução/Revisão Bibliográfica	15
Tumores Mamários Caninos	15
Via de Sinal Notch	17
Materiais e Métodos	18
Resultados	20
Discussão.....	23
Conclusão e Perspectivas Futuras	27
Bibliografia	28
Anexos	31

Patologia Renal em Animais de Companhia- Alterações Macroscópicas e Histopatológicas

Casuística das Necrópsias das Aulas de Anatomia Patológica I

Uma das vertentes do presente estágio consistiu na participação nas necrópsias realizadas no âmbito das aulas práticas de Anatomia Patológica I, na selecção, recolha de amostras de tecidos e observação histológica das mesmas. Durante este período foram realizadas 72 necrópsias, todas de animais de companhia, nomeadamente cães (n=37), gatos (n=34) e coelho (n=1). Estes animais foram enviados de diversas clínicas e hospitais veterinários e do canil municipal do Porto, sendo na maior parte das vezes acompanhados de historial clínico breve. Em alguns casos não foi possível apurar a exacta causa de morte, uma vez que o diagnóstico se baseava unicamente na história clínica, observação macroscópica das lesões e análise histopatológica das mesmas. No entanto, foi possível distinguir quatro tipos de lesões/patologias: *Neoplásicas* (que envolve todas as neoplasias de origem epitelial, mesenquimatosa, ou de células redondas, que afectam qualquer sistema de órgãos, de carácter benigno ou maligno), *Inflamatórias* (que abrange todas as lesões inflamatórias de causa indeterminada, infecciosa, tóxica ou outras), *Traumáticas* (como, por exemplo, quedas, atropelamentos, agressões) e *Outras* (todas as patologias que não se encaixam nas categorias anteriores). A maioria das lesões encontradas, 43%, pertence à categoria *Inflamatórias*. Seguem-se as neoplasias, que correspondem a 34% das patologias encontradas, a categoria *Outras* com 13% e as lesões traumáticas com 9,7%.

Achados Patológicos do Aparelho Urinário

Verificou-se que, na necrópsia, 27 dos 72 animais (37,5%) apresentavam alterações renais visíveis macroscopicamente, tendo sido feita recolha de fragmentos do órgão para análise histopatológica em 23 casos. Verificaram-se também alterações nas vias urinárias inferiores, em 21,7% dos casos. Identificaram-se apenas 3 casos com alterações na bexiga (11%), correspondentes a cistites, 1 caso com dilatação dos ureteres (4%) e 1 caso de patologia na uretra (4%), correspondente a uretrite hemorrágica. Tendo em conta o grande número de animais com patologia renal, considerou-se pertinente o estudo mais detalhado e a descrição das alterações macroscópicas e histopatológicas mais comuns associadas à patologia renal.

Neste caso a patologia renal afectou igual número de cães e gatos (n=13, 48%) e estava também presente no coelho (n=1). Verificou-se que 66,7% destes animais correspondiam a animais geriátricos, ou seja, cães e gatos com idade superior a 10 anos, e que os restantes 33,3% (n=9) correspondiam a animais jovens ou adultos com idade inferior a 10 anos. Neste grupo de animais, 81,5% (n=22) apresentavam alterações compatíveis com insuficiência renal crónica, 11,1% (n=3) apresentavam alterações compatíveis com insuficiência renal aguda, e apenas 7,4% (n=2) apresentavam alterações renais devido à presença de metástase de tumores primários, com sede noutros órgãos, nomeadamente linfoma multicêntrico e carcinoma urotelial.

1. Achados Macroscópicos

As alterações macroscópicas mais comuns observadas nas necrópsias de animais com doença renal foram alterações de cor (n=14), contorno (n=13) e tamanho dos rins (n=10). Identificaram-se 14 casos com alterações de cor renal, em 3 casos alterações na superfície e os restantes ao corte sagital. A nível de superfície, verificou-se 1 caso com alteração de cor esverdeada-avermelhada em cunha, correspondente a um enfarte renal (Fig. D Anexo I), 1 caso com alteração uniforme de ambos os rins para vermelho muito escuro correspondente a congestão e hemorragia, e 1 caso com várias manchas de cor vermelho escuro, correspondentes a focos de hemorragia. Ao corte sagital, verificaram-se 5 casos com alteração de cor da medula, que se encontrava com cor branco-nacarado, 4 casos com estriação avermelhada principalmente no córtex, e 2 casos onde se observou a existência de um halo amarelado-avermelhado na pélvis renal, correspondente a necrose da crista renal (Fig. E, Anexo I). Em 13 casos verificou-se a presença de pequenos quistos (Fig. C, Anexo I) e massas (Fig. B, Anexo I) de distribuição focal a difusa na superfície renal. Nos animais com alterações de tamanho renal, os rins encontravam-se com tamanho diminuído (atrofia), maioritariamente de forma unilateral (n=7) podendo o rim atrofiado apresentar $\frac{1}{2}$ ou até $\frac{1}{4}$ do tamanho do rim contralateral (Fig. A, Anexo I). Em apenas 1 caso se verificou atrofia renal bilateral. A presença de renomegália verificou-se em apenas 2 casos, num de forma bilateral e no segundo de forma unilateral. Ao corte sagital, o ratio córtex-medula deverá ser 1:2 a 1:3 em rins normais, sendo que o córtex deverá ocupar 80% do órgão (Jubb *et al.* 2015). Em 5 casos, o corte sagital dos rins revelou alteração deste ratio, não tendo sido possível distinguir o limite entre as duas áreas do parênquima renal em 3 casos. Num dos casos verificou-se diminuição do córtex e noutro caso diminuição da medula. Em 4 casos a descapsulação dos rins revelou-se difícil, devido à existência de aderências fibrosas entre a

cápsula e a superfície renal, sendo este aspecto sugestivo de patologia renal crónica. Em 4 casos de necrópsia, verificou-se que a superfície renal apresentava pontilhado de distribuição difusa, padrão que poderia ser sugestivo de doença glomerular, nefrite intersticial multifocal ou deposição de amilóide (se esta se concentrar nos glomérulos).

Na necrópsia, é possível observar outros indicadores de doença renal crónica, nomeadamente as lesões não renais associadas à urémia. A urémia é caracterizada pela elevação da ureia na circulação sanguínea, sendo uma síndrome clínica da insuficiência renal, provocada pela falha na excreção de produtos de metabolismo pelo rim (Jubb *et al.* 2015). As alterações do metabolismo cálcio-fosforo induzem a mineralização metastática de vários órgãos, principalmente o rim, língua, mucosa gástrica, paredes alveolares e arteríolas pulmonares, espaços intercostais (Fig. A, Anexo II), endocárdio e endotélio dos grandes vasos. Do grupo de animais com doença renal, 10 animais apresentavam mineralização, 2 no coração, 2 no pulmão, 1 no rim, 1 no fígado, 1 na língua e 1 no estômago. Em 2 animais detectou-se a presença de mineralização na mucosa traqueal, local menos comum deste tipo de lesão (Fig. C, Anexo II). A produção de grande quantidade de amónia pelas bactérias a partir da ureia salivar ou gástrica apresenta um efeito corrosivo nas superfícies mucosas da cavidade oral e estômago, levando ao desenvolvimento de úlceras. A estomatite ulcerativa e necrótica (Fig. B, Anexo II) caracteriza-se pela presença de material mucoso acastanhado, aderido preferencialmente às margens laterais da língua e cavidade bucal, sendo as úlceras mais comuns na base da língua onde há maior acumulação de saliva pelo efeito da gravidade (Zachary & McGavin 2012). No grupo de animais deste estudo, detectou-se a presença de estomatite ulcerativa em 3 animais e gastrite ulcerativa em apenas 1 animal. Os animais insuficientes renais, com elevados níveis de urémia desenvolvem normalmente edema pulmonar terminal, podendo estar ou não associado a congestão pulmonar. Esta lesão é decorrente do aumento da permeabilidade dos capilares alveolares devido a degenerescência e necrose vascular (Jubb *et al.* 2015). Macroscopicamente reconhece-se pela presença de espuma de cor branca no lúmen das vias aéreas. Foi identificada a presença de edema alveolar em 6 casos. Destes animais, 4 foram eutanasiados com recurso a fármacos barbitúricos, pelo que o edema alveolar observado poderá não ser consequente à doença renal, mas sim aos efeitos do fármaco durante o período de respiração agónica.

Os achados anteriores são os que se verificaram mais frequentemente nas necrópsias, embora estejam descritos outros, nomeadamente trombose atrial e aórtica, anemia hipoplástica, osteodistrofia fibrosa e hiperplasia da paratiróide (Zachary & McGavin 2012).

2. Alterações Histopatológicas

2.1 Doença Glomerular

A doença glomerular é uma causa de doença renal crónica em cães, embora pareça ser menos comum em gatos. Apesar da sua prevalência ser desconhecida, a incidência da doença glomerular foi estimada entre 43% a 90% em cães seleccionados aleatoriamente. As doenças glomerulares podem desenvolver-se em qualquer idade, no entanto são mais prováveis em animais de meia-idade e geriátricos (Vaden *et al.* 2011).

As lesões glomerulares primárias resultam da deposição de complexos imunes, trombos, êmbolos (bacterianos ou outros), ou infecções bacterianas ou virais directas dos componentes glomerulares (Zachary & McGavin 2012). Os glomérulos também podem ser afectados em várias doenças sistémicas como, por exemplo, a amiloidose (Jubb *et al.* 2015). Estão descritas ainda glomerulopatias familiares relacionadas com diversas raças caninas, cada uma com diferentes mecanismos fisiopatológicos (Vaden *et al.* 2011).

O diagnóstico e classificação da doença glomerular em cães tem sido baseado no sistema de classificação da WHO (*World Health Organization*) para a doença glomerular humana. Apesar das doenças glomerulares caninas partilharem muitos aspectos com a patologia glomerular humana, existem diferenças significativas (Ciancolo *et al.* 2016).

Para descrição histopatológica das alterações glomerulares, deve ser avaliada: a distribuição das lesões no corte histológico, utilizando os termos difusa (quando a lesão envolve mais de 50% dos glomérulos) ou focal (quando a lesão envolve menos de 50% dos glomérulos); e a distribuição da lesão dentro do glomérulo, como global (envolve todo o tufo glomerular), segmentar (quando afecta apenas parte do glomérulo) e mesangial (quando afecta primariamente a área mesangial) (Jubb *et al.* 2015).

O termo glomerulonefrite designa a presença de alterações tubulointersticiais e vasculares associadas a doença glomerular primária. A glomerulonefrite pode resultar da deposição nos glomérulos de complexos imunes circulantes, da formação *in situ* de anticorpos contra a membrana basal glomerular ou pela activação do sistema de complemento por outras vias (Jubb *et al.* 2015). Histologicamente, os glomérulos afectados podem apresentar um espectro alargado de alterações, que podem ser classificadas como membranosas, proliferativas, membranoproliferativas e mesangioproliferativas (Jubb *et al.* 2015). As alterações macroscópicas de glomerulonefrite podem ser subtis. Os rins afectados podem estar ligeiramente

tumefactos, de superfície lisa, de cor normal ou mais pálida e apresentar pequenos pontos vermelhos no córtex (Zachary & McGavin 2012). No grupo de animais incluídos neste estudo, detectou-se a presença de espessamento da cápsula de Bowman em 8 casos, 7 em gatos e apenas 1 em cão. Nestes corpúsculos renais a cápsula de Bowman encontrava-se espessada, podendo atingir até o dobro da sua espessura normal, de forma global ou parcial, que também se encontrava hialinizada (Fig C, Anexo III). Este achado é sugestivo de doença glomerular subaguda ou crónica, onde a lesão é severa e prolongada (Zachary & McGavin 2012). Na doença renal crónica, os tufo glomerulares afectados diminuem de tamanho e tornam-se hialinizados devido ao aumento do tecido conjuntivo fibroso e matriz mesangial e perda de capilares glomerulares, processo designado como glomeruloesclerose (Zachary & McGavin 2012). Os glomérulos com glomeruloesclerose global são também designados de glomérulos obsolescentes (Jubb *et al.* 2015) (Fig. A e B, Anexo III). Recentemente, foi reconhecida em cães a glomeruloesclerose focal segmentar que, segundo WSAVA-RSSG (*World Small Animal Veterinary Association Study Group*), é definida como esclerose que afecta menos de 50% de um tufo glomerular e menos de 50% dos glomérulos de uma amostra (Ciancolo *et al.* 2016).

Um estudo de comparação entre o estadio bioquímico e histopatológico em gatos com doença renal crónica concluiu que as lesões de glomerulosclerose eram mais severas com a progressão da doença, sendo outras lesões glomerulares mais raras (McLeland *et al.* 2015).

Apesar das alterações glomerulares serem identificáveis na coloração de rotina hematoxilina e eosina, podem ser utilizadas outras colorações histoquímicas para facilitar o seu diagnóstico como, por exemplo, a reacção do Ácido Periódico de Shiff (PAS) que cora as membranas basais dos capilares glomerulares, matriz mesangial, membrana basal da cápsula de Bowman e membranas basais tubulares; e o Tricrómio de Masson que facilita a avaliação da fibrose e, em alguns casos, dos imunocomplexos que são identificados como material nodular vermelho ao longo da membrana nasal glomerular (Jubb *et al.* 2015).

Neste conjunto de animais foram identificados 11 casos de glomerulosclerose, 3 casos em cães e 8 casos em gatos. Nos cães, todos os casos apresentavam imagens de glomerulosclerose em mais de 50% do corte histológico, tendo sido classificada como glomerulosclerose difusa. Num dos casos a glomerulosclerose foi classificada como global, afectando todo o glomérulo, e nos restantes 2 casos foi classificada como segmentar, afectando apenas parte do glomérulo. Nos gatos, em todos os casos a glomerulosclerose foi classificada como difusa e, a nível da área glomerular afectada, 5 casos apresentavam glomerulosclerose global, e os restantes 3 casos apresentavam glomerulosclerose segmentar. Nos casos de glomerulosclerose global,

particularmente nos gatos, os glomérulos obsoletos estavam associados a infiltrado inflamatório mononuclear, composto principalmente por linfócitos e plasmócitos, e por adipócitos maduros de tamanhos variáveis presentes no interstício.

2.2 Quistos renais e doença glomeruloquística

Os quistos renais são estruturas esféricas de paredes finas e tamanho variável com conteúdo líquido transparente e seroso (Zachary & McGavin 2012). Estas estruturas podem desenvolver-se em qualquer parte do nefrónio, incluindo no espaço de Bowman ou no sistema colector (Jubb *et al.* 2015) (Fig. D, Anexo III). Estão descritos três mecanismos, não mutualmente exclusivos, que levam à formação de quistos renais: lesões obstrutivas, alterações das membranas basais tubulares, que resultam na formação de dilatações saculares ou fusiformes dos túbulos, e na proliferação desorganizada das células epiteliais tubulares (Jubb *et al.* 2015).

Doença glomeruloquística é o termo utilizado quando os quistos envolvem o espaço de Bowman, sendo uma forma pouco comum da doença renal poliquística (Jubb *et al.* 2015). Apesar de alguns patologistas considerarem esta lesão um achado acidental, em alguns casos pode ser indicativo de doença renal, glomérulos atubulares e nefropatia obstrutiva (Ciancolo *et al.* 2016). Histologicamente, os rins com doença glomeruloquística apresentam alterações difusas, nas quais os corpúsculos renais apresentam dilatação marcada do espaço de Bowman associada a atrofia ou ausência do tufo glomerular, com espessamento das membranas basais que se encontram também tortuosas (Takahashi *et al.* 2005) (Fig. E, Anexo III). Os corpúsculos dilatados contendo filtrado eosinofílico podem fazer lembrar o tecido da tiróide, pelo que esta característica histológica é muitas vezes designada por tiroidinização.

Na análise histopatológica das amostras foram identificados 13 casos com quistos tubulares, 6 em cães e 7 em gatos. Estes apresentavam formas e tamanhos variáveis, sendo identificados predominantemente no córtex renal. Foram também identificados 10 casos com doença glomeruloquística, 7 em cães e apenas 3 em gatos.

2.3 Nefrite Intersticial

A nefrite intersticial, que consiste numa reacção inflamatória centrada no interstício renal (cortical ou medular), é muito comum em cães e gatos, tanto como doença primária como de forma secundária a lesões glomerulares e tubulares. Pode ser provocada por diversos agentes infecciosos e causas não infecciosas, e apresentar-se de forma aguda, subaguda ou crónica (Jubb *et al.* 2015). A nefrite intersticial está normalmente associada à presença de infiltrado

inflamatório mononuclear, composto principalmente por linfócitos e plasmócitos (Fig. F, Anexo III), podendo estar presentes outros tipos de leucócitos como, por exemplo, neutrófilos na nefrite tubulointersticial aguda, provocada por tóxicos ou agentes infecciosos (Zachary & McGavin 2012). Em muitas situações o infiltrado inflamatório é apenas visível microscopicamente e não está associado a insuficiência renal, representando uma alteração accidental inespecífica (Zachary & McGavin 2012). As células inflamatórias podem distribuir-se de forma difusa pelo parênquima renal ou ter distribuição focal (Zachary & McGavin 2012). Em situações crônicas à nefrite intersticial podem estar associadas a fibrose intersticial e atrofia tubular (Jubb *et al.* 2015). Na doença renal crônica, a severidade da inflamação é semelhante nos estádios mais precoces e significativamente menor nos estádios mais avançados (McLeland *et al.* 2015).

A nefrite intersticial foi a lesão mais frequente no conjunto destes animais, tendo sido identificados em 20 casos, 10 em cães e 10 em gatos. A nefrite intersticial foi classificada como multifocal em 9 cães e em 6 gatos, e como difusa em apenas 1 cão e em 4 gatos. Na maioria dos casos, o infiltrado inflamatório consistiu em plasmócitos e linfócitos, tendo sido identificados também macrófagos.

2.4 Fibrose Tubulointersticial

A fibrose tubulointersticial consiste na substituição do parênquima renal, incluindo túbulos e interstício, por tecido conjuntivo fibroso. Pode ocorrer como evento primário, mas mais frequentemente é uma alteração crônica secundária a lesão tubular ou glomerular pré-existente (Zachary & McGavin 2012). Muitos factores implicados na progressão da insuficiência renal crônica, como proteinúria, hipertensão sistêmica, inflamação, anemia, hipóxia, envelhecimento e hiperfosfatemia são promotores de fibrose (Brown *et al.* 2016). Recentemente, McLeland e colaboradores (2015) concluíram que a fibrose é a única alteração histológica renal cuja gravidade acompanha o estadió IRIS (*International Renal Interest Society*: sistema de classificação dos estádios da doença renal crônica de acordo com os níveis séricos de creatinina) sendo a lesão que melhor se correlaciona com a severidade do grau de azotemia, hiperfosfatemia e anemia (McLeland *et al.* 2015).

Microscopicamente a fibrose é caracterizada por um aumento do tecido conjuntivo intersticial, pela deposição colagénio, e ausência de túbulos renais (Fig. G e H, Anexo III). Os túbulos restantes são normalmente atrofícos, e apresentam membrana basal espessada e hialinizada. Apesar da fibrose ser facilmente identificada na coloração de rotina de hematoxilina e eosina, existem colorações histoquímicas especiais para evidenciar a fibrose, como o Tricrómio

de Masson, que cora as fibras de colagénio de azul, e a coloração de van Giemson, que cora as fibras de colagénio de magenta pela fucsina, que contrastam com as restantes células que coram de amarelo (Pires *et al.* 2004).

Nos animais estudados, 13 apresentavam fibrose renal, 8 cães e 5 gatos.

2.5 Amiloidose

A amiloidose consiste num grupo heterogéneo de doenças caracterizado pela deposição extracelular de material proteico eosinofílico homogéneo – amilóide – em diferentes locais, principalmente nos glomérulos renais no cão e na medula renal no gato (Jubb *et al.* 2015). As fibrilhas de amilóide possuem configuração- β , sendo normalmente identificadas pelo facto de demonstrarem bi-refringência de cor verde maçã sob luz polarizada (Fig. M Anexo III), após a coloração especial Vermelho do Congo (Shtrasburg *et al.* 2005). Na literatura está descrito que no gato os depósitos de amilóide são frequentemente negativos à coloração de Vermelho do Congo, podendo ser evidenciados pela Tiofavina T (Pires *et al.* 2004). Nos gatos estudados não se observou essa condição, uma vez que os depósitos de amilóide foram positivos para o Vermelho do Congo após luz polarizada (Fig. L, Anexo III).

Macroscopicamente, os rins com amiloidose apresentam-se pálidos, aumentados de tamanho, com superfície capsular com granulação fina de aspecto encerado, semelhante à casca de laranja (Fig. I, Anexo III). Os glomérulos com amilóide podem ser visíveis macroscopicamente, identificando-se como um padrão pontilhado na superfície renal (Zachary & McGavin 2012). Uma forma de obter um diagnóstico presuntivo desta patologia é através da imersão dos rins afectados numa solução iodada, onde os glomérulos com amilóide coram de vermelho-acastanhado (Jubb *et al.* 2015).

Histologicamente, a amiloidose glomerular identifica-se pela deposição de material hialino, eosinofílico e homogéneo nos espaços extracelulares dos glomérulos que se encontram aumentados, devido à distensão difusa do tufo glomerular que pode até parecer acelular (Zachary & McGavin 2012). A amilóide pode também depositar-se nas membranas basais dos túbulos, que se encontram hialinizadas e espessadas. O mesmo material amorfo pode ser identificado também nos espaços intersticiais, principalmente na medula renal (Fig. J, Anexo III) (Pires *et al.* 2004).

A forma mais comum de amiloidose nos animais domésticos é a amiloidose secundária ou reactiva, normalmente idiopática, mas que pode estar associada a inflamação crónica, infecção ou neoplasia (Segev *et al.* 2012). Está também identificada uma predisposição

hereditária para amiloidose em cães de raça Shar-Pei e gatos de raça Abissínio (Zachary & McGavin 2012).

Nos animais estudados foram identificados 5 casos de amiloidose, 2 em cão e 3 casos em gato. Relativamente aos casos em cães, o primeiro foi detectado numa cadela sem raça definida, com 14 anos de idade, e a substância amilóide estava depositada na medula. O segundo caso em cão ocorreu num Cocker Spaniel macho, com 12 anos de idade, tendo sido identificada a presença de substância amilóide a nível glomerular. Nos 3 gatos em que se identificou a amiloidose, esta encontrava-se depositada a nível do interstício medular.

2.6 Necrose da Crista Medular

A necrose da crista medular é a reacção da medula interna à isquémia, podendo ter origem primária ou secundária (Zachary & McGavin 2012). Ocorre como doença primária em animais tratados com anti-inflamatórios não-esteróides (AINE's). Apesar do mecanismo exacto de lesão ainda não ter sido esclarecido, a literatura indica que, os efeitos citotóxicos directos e a isquémia, devido à inibição da vasodilatação pelas prostaglandinas renais, como resultado da inibição das ciclooxygenases (COX), são factores importantes para o desenvolvimento de necrose (Tsuchiya *et al.* 2005). A necrose da crista medular pode também ser secundária a compressão dos vasa recta ou da papila renal em casos de obstrução urinária, amiloidose e pielonefrite. Nestes casos, a compressão dos vasos intersticiais será o mecanismo que levará à necrose (Jubb *et al.* 2015).

Macroscopicamente, o tecido afectado pode apresentar-se de coloração amarelo-esverdeada ou rosa. Posteriormente o tecido necrótico torna-se descolorado e destaca-se, seguindo através dos ureteres (Zachary & McGavin 2012).

Histologicamente, as células apresentam o aspecto característico de necrose, com citoplasma rosa homogéneo eosinofílico, aspecto pálido, com perda de aderência à membrana basal e às células vizinhas, encontrando-se livres no lúmen tubular. (Fig. N, Anexo III) (Zachary & McGavin 2012).

No conjunto dos animais estudados, foram identificados apenas 2 casos de necrose da crista medular, um num gato e outro num cão.

2.7 Cilindrúria

Os cilindros correspondem a moldes intraluminais compostos por matriz proteica com ou sem células associadas. Os cilindros formam-se pela precipitação de proteína e células intactas,

organelos celulares ou restos celulares, que podem estar presentes no lúmen tubular. Estes formam-se nos túbulos contornados distais como consequência da acidez, elevada concentração de solutos e fluxo diminuído nesses segmentos do nefrónio (Chew *et al.* 2011). Os cilindros hialinos são compostos por precipitados proteicos de mucoproteína Tamm-Horsfall, e normalmente apresentam pouco significado patológico, podendo ser formados de forma transitória em muitas situações, incluindo febre, exercício e congestão renal passiva (Chew *et al.* 2011). Na histopatologia, identificam-se como material seroso uniforme eosinofílico que ocupa todo o comprimento ou uma secção dos túbulos (Frazier *et al.* 2012). Os cilindros celulares são denominados de acordo com o tipo celular predominante. Os cilindros de células epiteliais formam-se a partir do aprisionamento das células epiteliais pela mucoproteína presente em casos de necrose tubular aguda e pielonefrite, implicando lesão tubular severa. Os cilindros de eritrócitos e de leucócitos são mais raros. Os cilindros de eritrócitos formam-se consequentemente a hemorragia renal e os cilindros de leucócitos formam-se devido a inflamação renal como, por exemplo, pielonefrite (Chew *et al.* 2011). O termo tiroidinização (aspecto histológico tipo tiróide) em contexto renal designa a acumulação de material hialino tipo colóide composto pela glicoproteína Tamm-Horsfall (THP) nos túbulos (Fig. O, Anexo III) e espaço de Bowman (Jubb *et al.* 2015). A THP é secretada pela porção ascendente da ansa de Henle e pela porção proximal do túbulo contornado distal. Apesar do papel desta glicoproteína permanecer desconhecido, esta exerce potentes efeitos imunoreguladores. A tiroidinização renal ocorre devido a infecções do tracto urinário como, por exemplo, pielonefrites crónicas, e obstruções como no caso de urolitíase e refluxo vesículo-ureteral (Ito *et al.* 2009).

Foram identificados 4 casos de cilindrúria nos animais estudados, 2 casos em cães e 2 casos em gatos, nomeadamente cilindros hialinos.

2.8 Cristalúria

O desenvolvimento de cristalúria decorre da saturação da urina com substâncias derivadas de doenças metabólicas, hereditárias ou produtos tóxicos que sofrem precipitação. Os principais tipos de cristais urinários incluem oxalato de cálcio, ácido úrico e uratos, estruvite, cistina, purinas e alguns produtos tóxicos (Daudon & Frochot 2015). Os cristais são visíveis no lúmen dos túbulos contornados e colectores, embora possam dissolver-se no decorrer da fixação e processamento histológico das amostras (Frazier *et al.* 2012). A retenção renal dos cristais pode conduzir à formação de cálculos urinários, levando a uma nefropatia obstrutiva. Apenas alterações patológicas podem provocar lesão e disfunção renal passíveis de conduzir à retenção

de cristais e consequente formação de cálculos (Khan 2006). Os cristais podem incitar também a degenerescência e necrose do epitélio tubular adjacente (Frazier *et al.* 2012). Histologicamente, a cristalúria caracteriza-se pela presença de material vítreo, de aspecto refringente e coloração diversa no lúmen das estruturas tubulares, podendo ser observada tanto no córtex como na medula renal (Fig. P, Anexo III).

Nos casos observados foram identificados 6 casos de cristalúria, 3 em cães e 3 em gatos, sendo visíveis com maior frequência nos túbulos medulares.

2.9 Mineralização Renal

Os sais de cálcio podem depositar-se na forma de fosfatos ou carbonatos nos tecidos. Este processo designa-se calcificação e pode ocorrer sob a forma de calcificação distrófica ou calcificação metastática. A calcificação distrófica ocorre em tecidos em degenerescência ou necrose, em situações de normocalcemia (Pires *et al.* 2004). A deposição de sais de cálcio em tecidos normais como resultado de desequilíbrios nos níveis de cálcio e fósforo sistémicos designa-se calcificação metastática, alteração comum na insuficiência renal (Zachary & McGavin 2012). A mineralização renal é resultante do hiperparatiroidismo secundário induzido pela insuficiência renal crónica e coexiste com depósitos semelhantes nos pulmões, mucosa gástrica e outros órgãos (Jubb *et al.* 2015).

Macroscopicamente, os depósitos de cálcio são identificados como áreas brancas firmes, circunscritas, crepitando como osso ou pedra. Na análise histopatológica de rotina com a coloração hematoxilina e eosina, os depósitos de cálcio apresentam cor roxa e são refringentes (Pires *et al.* 2004). As colorações diferenciais para identificação de sais de cálcio são as colorações especiais de von Kossa e Alizarin Red. O método de von Kossa não é específico de cálcio mas cora fosfatos e carbonatos (Jubb *et al.* 2015).

Foram identificados 10 casos de mineralização renal afectando 4 cães e 6 gatos, sendo mais frequente a mineralização da membrana basal tubular (Fig. Q, Anexo III).

2.10 Alterações Tubulares

As alterações dos túbulos renais reflectem-se maioritariamente a nível das células epiteliais e membranas basais tubulares (Jubb *et al.* 2015). As células epiteliais tubulares podem responder à lesão através de degenerescência, necrose, apoptose e/ou atrofia, e a membrana basal pode responder sofrendo ruptura ou espessamento (Zachary & McGavin 2012). A capacidade de regeneração do rim é limitada, e a sua resposta à destruição de túbulos renais consiste em

hipertrofia compensatória dos restantes nefrónios (Jubb *et al.* 2015). Uma vez que todos os componentes do rim são interdependentes, as lesões renais irreversíveis, afectando grande percentagem de glomérulos e de túbulos, irão eventualmente resultar em disfunção, descompensação e doença renal crónica, da qual a atrofia tubular marcada é característica (Frazier *et al.* 2012). A atrofia tubular pode ocorrer de forma secundária a compressão externa causada por massas ou abscessos, fibrose intersticial, obstrução intra-tubular, diminuição da perfusão glomerular e filtração, e tensão de oxigénio reduzida (Zachary & McGavin 2012). Histologicamente, a atrofia tubular caracteriza-se pelo espessamento da membrana basal e perda da definição das células epiteliais com colapso do lúmen, normalmente com fibrose intersticial associada (Fig. S, Anexo III) (Frazier *et al.* 2012). Deve ser distinguida de lesão tubular aguda na qual a membrana basal permanece normal (Jenette *et al.* 2007). As células epiteliais podem sofrer apoptose, que envolve uma sequência de eventos que inclui fragmentação do DNA, formação de corpos apoptóticos, fagocitose, digestão e eliminação pelas outras células. Histologicamente é difícil identificar a presença de células em apoptose, uma vez que este é um processo que pode durar desde alguns minutos a várias horas (Menè *et al.* 2003). Perante situações de isquémia e hipóxia, as células epiteliais tubulares podem sofrer necrose tubular aguda, apresentando um aspecto eosinofílico, núcleos picnóticos e destacamento para o lúmen tubular onde podem formar cilindros (Jubb *et al.* 2015). A necrose tubular aguda é um evento auto-limitante, desde que a sua causa seja removida e que a integridade da membrana basal tubular se mantenha, pois esta serve de guia para a reconstituição de novo epitélio polarizado, em conjunto com o suprimento sanguíneo conservado para o compartimento tubulointersticial (Menè *et al.* 2003). A renovação do epitélio tubular ocorre através do processo de mitose das células vizinhas, sendo possível identificar figuras de mitose nas células epiteliais tubulares (Fig. R, Anexo III). As células epiteliais podem ainda sofrer degenerescência. À semelhança da necrose, degenerescência tubular pode ser resultado de uma variedade de agentes envolvendo hipóxia, formação de radicais livres, peroxidação ou alteração da sinalização celular. Os túbulos em degenerescência apresentam uma série de alterações morfológicas no epitélio renal, incluindo alterações tintoriais, vacuolização, destacamento celular e alterações de reparação. A degenerescência pode representar uma alteração reversível ou representar uma manifestação precoce de necrose irreversível (Frazier *et al.* 2012). A alteração clínica mais indicativa de lesão tubular é a detecção de proteinúria, uma vez que as proteínas filtradas pelo glomérulo deverão ser reabsorvidas pelos túbulos proximais (Chakrabarti *et al.* 2012). Apesar de ser uma alteração clínica pouco frequente em gatos constatou-se que, em gatos com doença renal crónica, a

proteinúria está associada ao aumento da severidade de degenerescência tubular e necrose, sendo por isso um marcador de disfunção tubular (McLeland *et al.* 2015). McLeland e colaboradores (2015) caracterizaram as alterações morfológicas renais em gatos com doença renal crônica, de acordo com cada estágio do IRIS e concluíram que a degenerescência e necrose tubular são significativamente mais severas nos estágios mais avançados (III e IV) da doença renal crônica.

A seguir à nefrite intersticial, as alterações de degenerescência e atrofia tubular foram as mais frequentes no conjunto dos animais estudados, afectando 70% dos animais (6 cães e 10 gatos). Esta percentagem poderá estar sobrestimada pois as amostras recolhidas apresentavam vários níveis de autólise, sendo difícil uma verdadeira distinção entre as alterações tubulares patológicas e as alterações decorrentes da autólise *pos-mortem*.

2.11 Enfarte Renal

Os enfartes renais são áreas de necrose de coagulação, que resultam de isquémia por obstrução vascular, normalmente decorrente tromboembolismo secundário a endocardite valvular, doenças parasitárias, placas de arterioesclerose, êmbolos de células neoplásicas e êmbolos sépticos (Zachary & McGavin 2012). Em gatos, a presença de enfartes renais pode ser indicativa de cardiomiopatia hipertrófica e tromboembolismo aórtico distal (Jubb *et al.* 2015). Como as artérias renais e as suas ramificações são vasos terminais, a oclusão de qualquer uma das suas ramificações levará à ocorrência de enfartes (Jubb *et al.* 2015). A extensão e sequelas do enfarte dependem do material que provoca a obstrução, tamanho, e número de vasos obstruídos. A obstrução da artéria renal provoca o enfarte de todo o órgão, a obstrução das artérias interlobares provoca enfarte de segmentos do córtex e medula e a obstrução de pequenos vasos como as artérias interlobulares provoca vários pequenos enfartes apenas no córtex, sendo esta apresentação a mais frequente (Jubb *et al.* 2015). Os êmbolos sépticos podem dar origem a microabscessos ou granulomas, dependendo do microrganismo envolvido (Zachary & McGavin 2012). Pouco tempo após a obstrução vascular, o tecido afectado encontra-se tumefacto, cianótico e congestionado, exibindo normalmente uma forma em cunha. Os enfartes apresentam uma zona central pálida de necrose de coagulação, e estão normalmente rodeados por área de congestão e hemorragia, por sua vez rodeada por uma margem pálida de leucócitos (Zachary & McGavin 2012). Dois a três dias após o enfarte, ocorre a lise dos eritrócitos e perda de hemoglobina, pelo que a área afectada fica com coloração mais pálida amarela-aczentada. Após uma a duas semanas, a zona necrótica é progressivamente substituída por tecido fibroso e o enfarte permanece como cicatriz em cunha, que provoca depressão na superfície renal (Jubb *et*

al. 2015). Microscopicamente, os nefrónios na zona central do enfarte sofrem necrose; na periferia, apenas os túbulos proximais estão necróticos devido à sua elevada taxa metabólica. Os glomérulos não costumam estar afectados. Após alguns dias a margem da zona central de necrose apresenta um infiltrado inflamatório, constituído maioritariamente por neutrófilos e alguns macrófagos e linfócitos. Os capilares adjacentes à área necrótica encontram-se engurgitados com eritrócitos. O tecido necrótico é fagocitado e então substituído por tecido fibroso culminando numa cicatriz (Zachary & McGavin 2012).

Nos animais estudados foram identificados 3 casos de enfarte renal, todos em cães. Num dos casos foi possível a identificação macroscópica do enfarte renal, ainda numa fase inicial do processo apresentando o rim afectado as típicas alterações na cor e na forma (em cunha). Este animal apresentava ainda alterações semelhantes noutros sistemas orgânicos, nomeadamente no pulmão, baço e coração. Histologicamente, todos estes órgãos apresentavam extensas áreas de necrose, hemorragia e infiltrado inflamatório, tendo sido ainda identificados trombos. O segundo caso de enfarte renal foi apenas detectado durante a análise histopatológica, caracterizando-se também pela presença de necrose de coagulação. No terceiro caso foi identificada a presença de fibrose em cunha desde o córtex até à medula, observando-se nessa área escassez de glomérulos e ausência total de túbulos. Esta área corresponde a um enfarte renal antigo.

2.12 Lípidos Intersticiais

Durante a análise histopatológica das amostras recolhidas, foi identificada a presença de células em forma de anel de sinete, de núcleo excêntrico e plano correspondentes a adipócitos maduros, no interstício renal de 8 animais (Fig. T-Z, Anexo III). Estas células correspondem a adipócitos maduros. Esta alteração foi identificada apenas em gatos adultos a geriátricos, em 4 machos e 4 fêmeas, de raça Europeu Comum à excepção de uma fêmea de raça Siamesa. Verificou-se que a presença destes lípidos está associada a outras alterações histopatológicas, nomeadamente a infiltrado inflamatório mononuclear, rico em plasmócitos e linfócitos (n=6), fibrose intersticial (n=4), glomerulosclerose (n=4), espessamento da membrana basal glomerular (n=3), amiloidose medular (n=2) e atrofia glomeruloquística (n=1). A presença destes adipócitos estava confinada ao córtex, não tendo sido identificados na medula em nenhum dos casos. Nos animais com atrofia renal unilateral, verificou-se que a percentagem de adipócitos no córtex é maior no rim atrofiado (com excepção de apenas um caso). Este achado parece ser sugerir que a proporção de adipócitos no interstício renal é mais elevada quanto maior for a severidade e a

cronicidade da patologia renal, sendo directamente proporcional à gravidade das alterações histopatológicas aos quais estão associados.

McLeland e colaboradores (2015) exploraram a relação entre os parâmetros clínicos de acordo com o sistema IRIS e os achados histopatológicos renais em gatos com insuficiência renal crónica, caracterizando e quantificando uma variedade de lesões intersticiais, glomerulares, tubulares e vasculares. Estes autores identificaram a presença de lípidos intersticiais nos gatos com insuficiência renal crónica, e verificaram que quase todos os gatos no estadio II do sistema IRIS apresentavam lípidos intersticiais, e que estes estavam presentes em todos os gatos do estadio IV. Estes lípidos intersticiais parecem ter origem nos lípidos que se acumulam no epitélio tubular após ruptura das membranas basais tubulares e lise celular (McLeland *et al.* 2015). Schmiedt e colaboradores (2016) testaram recentemente os efeitos *in vivo* da isquémia renal na função e histologia renal em gatos, detectando também a presença de gotas lipídicas intersticiais, algumas claramente associadas a túbulos renais rupturados, principalmente em áreas de inflamação granulomatosa. Segundo estes autores a presença destes lípidos é comum em gatos com insuficiência renal crónica (Schmiedt *et al.* 2016).

O estudo deste conjunto de animais permitiu verificar que as alterações renais são comuns nos animais de companhia. Em alguns casos, foram detectadas alterações macroscópicas e histopatológicas renais em animais assintomáticos e sem historial clínico de doença renal. Assim, será benéfico a sensibilização para a prevenção e rastreio da patologia renal em animais de companhia, principalmente em animais geriátricos, com recurso a exames laboratoriais (urianálise, hemograma e bioquímica sérica).

Estudo da Expressão Imunohistoquímica do Receptor Notch1 em Tumores Mamários Caninos

Introdução/Revisão Bibliográfica

Tumores Mamários Caninos

Os tumores mamários caninos (TMC) são a neoplasia diagnosticada mais frequentemente em cadelas inteiras, afectando cerca de 40% destes animais (Sleeckx *et al.* 2011; Vascellari *et al.* 2016). Cerca de 30%-50% dos TMC são malignos (Vascellari *et al.* 2016), e 50%-70% destes animais apresentam tumores múltiplos, sendo as glândulas mamárias abdominais e inguinais normalmente as mais afectadas (Sleeckx *et al.* 2011). Os factores de risco mais importantes para

o desenvolvimento de neoplasia mamária são a idade do animal e exposição hormonal. A maioria dos autores descreve picos de incidência desta patologia em animais entre os 8 e os 11 anos de idade. Cadelas mais jovens tendem a desenvolver tumores benignos e cadelas mais velhas tumores malignos (Sorensmo *et al.* 2011). As hormonas ováricas e seus receptores no tecido mamário são factores determinantes no desenvolvimento dos TMC, evidenciando-se pela diminuição da incidência de TMC em cadelas sujeitas a ovariectomia ou ovariohisterectomia (OVH) numa fase inicial da vida em comparação com cadelas inteiras ou sujeitas ao procedimento numa fase mais tardia (Kristiansen *et al.* 2016). A incidência de TMC foi registada como 0.05% em fêmeas sujeitas a OVH antes do primeiro cio, aumentando para 8% e 26% quando o procedimento foi realizado após o primeiro cio ou segundo cio, respectivamente (Salas *et al.* 2015). A administração de derivados da progesterona para prevenção do estro pode aumentar a incidência de TMC em cães (Sleeckx *et al.* 2011). Cadelas obesas, principalmente em idades mais jovens, apresentam maior risco de desenvolvimento de TMC. Em mulheres com neoplasia mamária, a obesidade provoca o aumento dos estrogénios livres em circulação, e este é possivelmente o mecanismo que aumenta o risco de desenvolvimento de TMC em cadelas obesas (Soremno *et al.* 2011). Existem ainda outros factores de risco como, por exemplo, a raça. Diferentes estudos demonstraram que a incidência de TMC é significativamente mais elevada em cães de raça pura comparativamente a animais sem raça definida, e algumas raças têm maior prevalência que outras (Vascellari *et al.* 2016). Alguns estudos demonstraram que certas linhagens e famílias dentro da mesma raça possuem mais risco de TMC, corroborando a importância da componente genética nos TMC (Soremno *et al.* 2011). Estão descritos também outros factores de risco como, por exemplo, a exposição a substâncias oncogénicas poluentes ambientais como os rodenticidas (Salas *et al.* 2015), e ainda a dieta. Alguns estudos demonstraram que animais com elevada ingestão de carnes vermelhas de porco e vaca possuem maior risco de desenvolvimento de TMC (Alenza *et al.* 2000).

Macroscopicamente os TMC apresentam-se como um ou mais nódulos, normalmente firmes e bem demarcados, cujo diâmetro pode variar desde alguns milímetros até 10-20 centímetros de diâmetro, muitas vezes ulcerados (Sleeck *et al.* 2011). De uma forma geral, os carcinomas metastizam através da via linfática para os gânglios linfáticos regionais. O pulmão é o órgão onde é mais comum a presença de metástases de TMC (Soremno *et al.* 2011). Os TMC caracterizam-se por uma morfologia muito variada, podendo ser observados tumores simples (com origem no epitélio luminal ou mioepitélio), complexos (envolvendo o epitélio luminal e mioepitélio), mistos (caracterizando-se pela presença de populações celulares epitelial e

mesenquimatosa) e mesenquimatosos (Peña *et al.* 2014). O sistema de classificação histológica mais utilizado actualmente pelos patologistas veterinários corresponde ao publicado em 1999 pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (Misdorp *et al.* 1999). Em 2011 Goldshmidt e colaboradores propuseram alterações ao sistema da OMS para criar uma classificação mais detalhada dos TMC. Algumas neoplasias mantêm a sua designação, mas outros são separados das suas categorias originais; para além disso inclui também novos tipos de TMC, nomeadamente o carcinoma inflamatório (Goldschmidt *et al.* 2011). Esta classificação mais exhaustiva requer a utilização de marcadores imunohistoquímicos, no sentido de determinar a histogénese das populações neoplásicas (Peña *et al.* 2014).

Via de Sinal Notch

A via de sinal Notch é uma via evolutivamente conservada que está implicada numa grande variedade de processos, incluindo determinação do destino celular, morfogénese, diferenciação, proliferação e morte celular (Yin *et al.* 2010). Os efeitos produzidos pela sinalização Notch em células normais variam consideravelmente de acordo com o contexto celular em que esta se insere. Uma vez que a via de sinal Notch está implicada em diversas funções biológicas vitais, compreende-se que a sua desregulação esteja frequentemente associada a várias neoplasias, nomeadamente cancro de mama, cólon, pulmão, cancro renal, e linfomas (Zhou *et al.* 2013). Nos mamíferos existem 4 receptores Notch (1-4) e pelo menos 5 ligandos das famílias Delta e JAG/Serrate (DSL): Jagged1, Jagged2, DII-1, DII-3 e DII-4 (Guo *et al.* 2011). Cada receptor é sintetizado como proteína precursora que consiste num domínio extracelular, transmembranar e intracelular, cada um com diferentes funções celulares (Yin *et al.* 2010). A via de sinalização Notch compreende duas clivagens proteolíticas da molécula inactivada que permitem uma terceira clivagem pela enzima γ -secretase na membrana plasmática, que culmina na activação do receptor Notch. A clivagem pela γ -secretase liberta o domínio intracelular do Notch (NICD), que é transportado para o núcleo onde interage com o repressor da transcrição CSL activando-o e recrutando co-activadores da transcrição (Zhou *et al.* 2013). Os receptores Notch activam muitos genes associados com a diferenciação, proliferação e sobrevivência celular, nomeadamente as famílias Hes e Hey (Hairy Enhancer of Split), ciclina D1 e c-Myc (Espinoza *et al.* 2013). A via de sinal Notch pode ter um papel oncogénico ou de supressão tumoral, dependendo do tecido e órgão no qual é expressa, e das vias de sinalização com a qual interage (Yin *et al.* 2010). Existem diversos estudos acerca do papel do Notch no cancro de

mama. O seu efeito carcinogénico está relacionado com a interacção com intermediários e outras vias de sinal envolvidas no processo de transformação neoplásica como, por exemplo, a via de sinal mTOR, factores de crescimento (HER, VEGF), citocinas inflamatórias, receptores de estrogénio, entre outros. A actividade da via de sinal Notch está aumentada em células neoplásicas de tumores mamários que não respondem aos tratamentos oncológicos (Ressel *et al.* 2014). A actividade do Notch está também aumentada nas células estaminais no cancro de mama (Espinoza *et al.* 2013; Guo *et al.* 2011). Os receptores Notch têm ainda um papel activo na angiogénese tumoral (Rehman & Wang 2006; Zhou *et al.* 2013) e metastização (Espinoza *et al.* 2013).

O receptor Notch1 tem sido um dos mais investigados em tumores mamários na mulher e em ratinhos. No entanto, no campo da Medicina Veterinária apenas Ressel e colaboradores (2014) descreveram a expressão imunohistoquímica da forma activa do Notch1 em tecidos mamários normais, hiperplásicos e neoplásicos em felinos. Até à data não existem estudos publicados acerca da expressão do Notch1 em tumores mamários caninos. O objectivo do presente estudo consiste na avaliação da expressão imunohistoquímica do Notch1 em carcinomas mamários caninos e no estudo da sua associação com o tipo e grau histológico das lesões neoplásicas.

Materiais e Métodos

Para realização deste trabalho foram seleccionados 39 casos de carcinomas mamários do tipo simples de cadela. Foram também seleccionadas 5 amostras de mama normal. Os casos foram seleccionados do arquivo do Laboratório de Patologia Veterinária do ICBAS-UP, tendo sido recolhidos entre os anos de 2009 e 2014. As amostras de glândula mamária normal foram recolhidas durante as necrópsias realizadas nas aulas práticas de Anatomia Patológica I. As amostras foram sujeitas a processamento histológico de rotina, tendo sido incluídas em parafina, sujeitas a cortes seriados de 3 µm e coradas com a coloração de hematoxilina e eosina. As lesões neoplásicas foram classificadas de acordo com o sistema de classificação da Organização Mundial de Saúde (Misdorp *et al.* 1999). Para a determinação do grau histológico dos tumores foi utilizado o método de Nottingham, que se baseia na avaliação da percentagem de formação de túbulos, nível de pleomorfismo nuclear e número de figuras de mitose (Elston & Ellis 1993).

A expressão do receptor Notch1 foi avaliada através da técnica de imunohistoquímica, utilizando o protocolo do método complexo Avidina-Biotina. Os tecidos em parafina foram sujeitos a cortes sucessivos de 3 µm e incluídos em lâminas adesivadas com APES (3-

aminopropyltriethoxysilane), as quais foram colocadas na estufa a 37° overnight. Os cortes foram desparafinados pela submersão duas vezes em xilol, e desidratados numa série ascendente de álcoois e sujeitos a água corrente durante 10 minutos. A recuperação antigénica foi realizada com solução de Extran®, com recurso ao microondas, durante 8 minutos, arrefecendo em TBS (Tris-buffered saline solution) durante 5 minutos. O bloqueio da peroxidase endógena realizou-se pela incubação das amostras em cuvete com peróxido de hidrogénio a 30% em 10% de metanol durante 10 minutos, sendo seguida por duas lavagens em TBS durante 5 minutos cada. Posteriormente as amostras foram incubadas com soro normal de coelho (Dako) em câmara húmida durante 20 minutos, numa diluição de 1/5 em BSA (Bovine serum albumine) a 10%. Após 2 lavagens em TBS foi aplicado o anticorpo primário (Notch1 polyclonal anti-goat, Santa Cruz Biotechnology®), numa diluição de 1/100 em BSA a 5%, tendo sido incubado em câmara húmida overnight a 4°C. Após duas lavagens em TBS foi aplicado o anticorpo secundário, coelho anti-goat biotinilado (polyclonal rabbit anti-goat Immunoglobulins biotinylated), em câmara húmida durante 30 minutos, numa diluição de 1/200 em BSA a 5%, à temperatura ambiente. As amostras foram submetidas posteriormente a duas lavagens com TBS e incubadas com o complexo avidina-biotina, numa diluição a 1% de A e B em BSA a 5% durante 30 minutos. Após duas lavagens com TBS, foi aplicado o cromogénio 3,3'diaminobenzina (Novocastra®), durante 6 minutos. As lâminas foram contrastadas com hematoxilina e montadas para observação ao microscópio óptico. Para controlo positivo interno utilizaram-se as células da epiderme e folículos pilosos da pele normal adjacentes à glândula mamária. Para controlo negativo foram utilizadas uma amostra de tecido mamário normal e uma amostra de carcinoma simples canino onde o anticorpo primário foi substituído por TBS.

A expressão do Notch1 foi considerada positiva quando se detectou a presença de marcação citoplasmática e/ou membranar acastanhada distinta. A avaliação da expressão do Notch1 baseou-se na percentagem de células neoplásicas marcadas sendo classificada como: grau 0: nenhuma célula marcada; grau 1: 1-25% de células marcadas; grau 2: 26%-50% de células marcadas; grau 3: 51-75% de células marcadas; grau 4: 76-100% de células marcadas (Ressel *et al.* 2014). A intensidade de marcação das células tumorais foi comparada com a marcação observada na epiderme e folículos pilosos e com o tecido mamário normal adjacente.

Para a análise estatística dos resultados foi utilizado o *software SPSS Statistics 24*. O teste de Qui-quadrado de Fisher (X^2) foi utilizado para associação entre as diferentes variáveis categóricas e um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Resultados

Classificação Histopatológica

No presente estudo foram incluídas 39 neoplasias mamárias e 5 amostras de mama normal de cadela. As neoplasias mamárias foram classificadas de acordo com as suas características histológicas em carcinomas tubulopapilares (n=23), carcinomas sólidos (n=14) e carcinomas anaplásicos (n=2).

Grau Histológico

Dos 39 carcinomas simples incluídos neste estudo, 12 (30,8%) foram classificados como grau I, 16 (41%) como grau II e 11 (28,2%) como grau III. A distribuição dos casos em função do tipo e grau histológicos está demonstrada na tabela I.

Tipo Histológico	Grau Histológico			Total
	Grau I	Grau II	Grau III	
<i>Carcinoma Tubulopapilar</i>	10	10	3	23
<i>Carcinoma Sólido</i>	2	5	7	14
<i>Carcinoma Anaplásico</i>	0	1	1	2
Total	12	16	11	39

Tabela I: Distribuição dos casos de acordo com o tipo e grau histológico.

Expressão Imunohistoquímica do Notch1

Tecido Mamário Normal

Nas amostras de glândula mamária normal de cadela a expressão do anticorpo Notch1 foi verificada de forma constante na epiderme e nos bulbos dos folículos pilosos, tendo estas estruturas sido utilizadas como controlo interno positivo (Fig. A, Anexo IV). Em todas as amostras de tecido mamário normal observou-se marcação de 76% a 100% das células epiteliais luminais, sendo a marcação exclusivamente citoplasmática (Fig. B, Anexo IV). As células mioepiteliais não evidenciaram imunomarcação. A intensidade de marcação do epitélio luminal da mama normal era semelhante à marcação da epiderme e folículos pilosos.

Tecido Neoplásico

A expressão imunohistoquímica do Notch1 nos carcinomas mamários foi variável relativamente ao grau de marcação, intensidade de marcação comparativamente à mama normal adjacente e estrutura celular marcada. Em todos os casos a expressão de Notch1 foi exclusiva das

células epiteliais luminais, não havendo marcação do mioepitélio. Relativamente à percentagem de células marcadas, apenas num caso não se observou marcação (grau 0), 2 casos apresentavam 1-25% de células marcadas (grau 1), outros 2 casos apresentavam 26-50% de células marcadas (grau 2), 4 casos apresentaram 51-75% de células marcadas, e os restantes 30 casos apresentavam 76-100% de células marcadas (grau 4).

Relativamente à estrutura celular marcada, todos os casos apresentavam marcação citoplasmática das células epiteliais luminais. No entanto em 16 (41%) casos observou-se um reforço de marcação membranar, nomeadamente na porção apical das células (Fig. D, Anexo III). Este reforço membranar verificou-se em 12 carcinomas tubulopapilares (2 de grau I, 7 de grau II e 3 de grau III), 2 carcinomas sólidos (ambos de grau III) e nos 2 carcinomas anaplásicos.

Nas amostras compostas por tecido mamário neoplásico e tecido mamário adjacente normal (n=31), comparou-se a intensidade de marcação do tumor relativamente ao tecido mamário adjacente e verificou-se que em 13 (42%) casos a intensidade de marcação do tumor era menor e, em 18 casos (58%), maior ou igual à intensidade de marcação da mama normal adjacente.

Para realização da análise estatística com base no tipo histológico, os carcinomas simples foram divididos em dois grupos, o primeiro, que incluía todos os carcinomas tubulopapilares e o segundo, que incluía os carcinomas sólidos e os carcinomas anaplásicos. Relativamente ao grau de marcação Notch1, as amostras foram também divididas em duas categorias, uma que incluía os tumores com 75% ou menos de células marcadas ($\leq 75\%$) e outra de tumores com mais de 75% de células marcadas ($> 75\%$).

Foram efectuados estudos de associação entre o tipo histológico e o grau de marcação Notch1, estrutura celular marcada e intensidade de marcação do tumor. Não foi identificada nenhuma associação estatisticamente significativa entre a expressão de Notch1 e o tipo histológico dos tumores (Tabela II).

Tipo Histológico	Grau de Marcação Notch1		Valor de p^*	Local de Marcação		Valor de p^*	Intensidade de Marcação		Valor de p^*
	$\leq 75\%$	$>75\%$		Cit	Cit+M		<	\geq	
CTP	5	18	1,000	11	12	0,182	6	13	0,262
CS+CA	4	12		11	4		7	5	
Total	9	30		22	16		13	18	

Tabela II: Associação entre o tipo histológico e as variáveis da expressão imunohistoquímica do Notch1. *Teste de Qui-quadrado (χ^2) de Fisher; CTP – Carcinoma Tubulopapilar; CS-Carcinoma Sólido; CA-Carcinoma Anaplásico; Cit- Citoplasma; Cit+M- Citoplasma + Membrana.

Foi estudada também a associação entre o grau histológico dos carcinomas e o grau de marcação Notch1, estrutura celular marcada e intensidade de marcação do tumor. Para o efeito os tumores foram divididos em dois grupos: baixo grau histológico (GI) e elevado grau histológico (GII+GIII). Verificou-se uma associação estatisticamente significativa entre o grau histológico dos tumores e a estrutura celular marcada pelo anticorpo Notch1. Constatou-se que os tumores de grau histológico mais elevado (GII+GIII) marcam indistintamente o citoplasma e a membrana celular; pelo contrário os carcinomas de grau I marcam preferencialmente o citoplasma (Tabela III).

Grau Histológico	Estrutura Celular Marcada		Valor de p^*
	Citoplasma	Citoplasma + Membrana	
GI	10	2	0,040
GII+GIII	12	14	
Total	22	16	

Tabela III: Associação entre o grau histológico dos carcinomas e a estrutura celular marcada. *Teste de Qui Quadrado (X^2) de Fisher.

Não se verificou a existência de associação estatisticamente significativa entre o grau histológico e o grau de marcação Notch1. No entanto, numericamente, parece existir uma tendência de os tumores de grau elevado (GII+GIII) apresentarem imunomarcação em mais de 75% das células. Enquanto que no grupo de tumores de grau I metade dos casos apresentaram em menos de 75% de células e a outra metade exibiu marcação em mais de 75% de células, nos tumores de grau elevado (GII+GIII), 88,9% dos casos apresentaram marcação em mais de 75% de células neoplásicas, e apenas 11,1% apresentaram marcação em menos de 75% das células (Tabela IV). Apesar de o valor de p ser estatisticamente significativo ($p=0,014$), 25% das células apresentavam valor esperado menor que 5, logo o teste do qui-quadrado não poderá ser considerado neste caso. Não se verificou associação estatisticamente significativa entre o grau histológico dos tumores e a intensidade de marcação dos tumores ($p=0,433$).

Grau Histológico	Grau de Marcação		Valor de p^*
	<75%	>75%	
GI	6	6	0,014**
GII+GIII	3	24	
Total	9	30	

Tabela IV: Associação entre grau histológico e grau de marcação Notch1. *Teste de Qui quadrado de Fisher (X^2). **Nota: 25% das células esperavam uma contagem menor que 5.

Foi também estudada a associação entre os diferentes parâmetros histológicos considerados na determinação do grau histológico de acordo com o Método de Nottingham, nomeadamente a formação de túbulos, pleomorfismo nuclear e actividade mitótica e as variáveis grau de marcação Notch1, estrutura celular marcada e ainda intensidade de marcação do tumor. Não foi detectada associação estatisticamente significativa entre nenhuma destas variáveis. No entanto, numericamente, parece haver uma tendência dos carcinomas com elevado grau de pleomorfismo (2+3) de apresentarem mais de 75% de células marcadas (25/29), ao contrário do que se verifica nos tumores com pleomorfismo reduzido (1) (Tabela V).

Pleomorfismo Nuclear	Grau de Marcação		Valor de p^*
	<75%	>75%	
1	5	5	0,032**
2+3	4	25	
Total	9	30	

Tabela V: Associação entre pleomorfismo nuclear e grau de marcação Notch1. *Teste de Qui-quadrado de Fisher (X^2). **Nota: 25% das células esperavam uma contagem menor que 5.

Discussão

A via de sinal Notch regula múltiplas funções, incluindo proliferação/diferenciação, motilidade e polaridade celular, pelo que é previsível que a actividade do receptor Notch1 possa afectar a capacidade de invasão, metastização e grau histológico dos tumores (Yuan *et al.* 2015).

Vários autores descrevem a acção do receptor Notch1 no cancro de mama na mulher e em ratinhos. Na literatura está descrita a existência de uma associação entre a sobre-expressão do receptor Notch1 e comportamento biológico agressivo dos tumores mamários, nomeadamente com a metastização ganglionar, recidiva e diminuição do tempo de sobrevida (Reedjik *et al.* 2005; Cao *et al.* 2014; Mittal *et al.* 2014). De acordo com Mungamuri e colaboradores (2006), a via de sinal Notch desempenha um papel de protecção contra a apoptose em células epiteliais da glândula mamária normal. Outros estudos *in vitro* descrevem que a utilização de inibidores da enzima γ -secretase cessa o ciclo celular das células neoplásicas e reverte a resistência destas células à apoptose, pela inibição da via de sinal Notch (Zang *et al.* 2007). Dos diferentes receptores Notch, o receptor Notch1 parece ser o que demonstra maior expressão em tecido mamário neoplásico (Paryan *et al.* 2016; Zang *et al.* 2007). Na área da Medicina Veterinária, está apenas publicado um estudo acerca da expressão imunohistoquímica do receptor Notch1 em tecido mamário normal, hiperplásico e neoplásico em gatas. Neste estudo verificou-se que a localização nuclear do NICD é consistente com as lesões hiperplásicas e que as lesões

neoplásicas apresentam marcação citoplasmática, consistente com activação de uma via de sinal Notch aberrante (Ressel *et al.* 2014). Assim, a via de sinal Notch (nomeadamente o receptor Notch1) parece ser um dos factores responsáveis pela transformação neoplásica em tumores de mama felinos.

Atendendo à importância que a via de sinal Notch1 desempenha no desenvolvimento de neoplasias mamárias na mulher, ratinhos e em felinos, é provável que esta via de sinal participe na patogénese dos tumores mamários caninos, uma vez que as cadelas partilham muitas características clínicas, morfológicas, biológicas e epidemiológicas com o cancro de mama na mulher (Queiroga *et al.* 2011; Pinho *et al.* 2012). Nenhum estudo acerca da acção da via de sinal Notch na tumorigénese mamária canina foi publicado até ao momento, pelo que neste estudo foi investigada a expressão imunohistoquímica da molécula Notch1 no tecido mamário normal e carcinomas simples de cadelas.

Nas amostras de glândula mamária normal de cadela utilizadas neste trabalho verificou-se a expressão sistemática do anticorpo Notch1 na epiderme e folículos em todas as amostras, indicativo da funcionalidade do anticorpo. Foi observada marcação citoplasmática em mais de 75% das células epiteliais lumbais em todas as amostras, não tendo sido observada qualquer marcação das células mioepiteliais. O mesmo padrão de marcação foi observado no tecido mamário normal adjacente às lesões neoplásicas.

Este padrão de marcação está de acordo com os resultados obtidos por outros autores que demonstraram a presença do receptor Notch1, ao nível do mRNA e a nível proteico, no epitélio luminal da glândula mamária da mulher (Stylianou *et al.* 2006; Zang *et al.* 2007; Zardawi *et al.* 2010; Ma *et al.* 2011; Touplikioti *et al.* 2012). O padrão de marcação na glândula mamária normal das gatas descrito por Ressel e colaboradores (2014) contrasta com os restantes estudos, uma vez que na maioria dos casos foi negativa para o receptor Notch1. A glândula mamária da cadela é um órgão dinâmico, dependente da acção hormonal, com actividade cíclica, que passa por fases consecutivas de desenvolvimento e regressão, que se traduzem em diferentes imagens histológicas. Este aspecto contrasta com a glândula mamária da mulher e ratinhos, onde a actividade cíclica é mínima (Santos *et al.* 2010). Os fenómenos pelos quais a glândula mamária é transformada ao longo do ciclo éstrico estão de acordo com as funções exercidas pelo receptor Notch1 de morfogénese, diferenciação e proliferação celular, pelo que este receptor parece participar no processo de remodelação da glândula mamária na cadela. Este facto parece estar demonstrado pelos resultados obtidos neste trabalho, onde a glândula mamária normal

apresentou consistentemente uma marcação de mais de 75% das células epiteliais luminais com marcada intensidade.

Neste estudo todas as amostras de tecido neoplásico evidenciaram marcação citoplasmática do receptor Notch1, sendo que apenas 16 casos apresentaram também reforço membranar apical de marcação. Não foi detectada marcação nuclear em nenhum dos casos. Yao e colaboradores (2011) estudaram o papel prognóstico dos receptores Notch1 no cancro de mama na mulher, utilizando o mesmo anticorpo deste trabalho. Nesse estudo imunohistoquímico detectaram marcação citoplasmática em 52% dos carcinomas, marcação membranar em 27% dos carcinomas e marcação nuclear em apenas 6% dos casos. Neste trabalho detectou-se uma associação estatisticamente significativa ($p=0,040$) entre o grau histológico dos TMC e a estrutura celular marcada. Verificou-se que os tumores bem diferenciados (Grau I) evidenciam preferencialmente marcação citoplasmática e que, dentro dos 16 tumores com reforço membranar, 14 são tumores moderadamente/pouco diferenciados (Grau II + Grau III). A presença do receptor Notch1 na superfície celular poderá permitir a ligação de mediadores e intermediários de outras vias de sinal que poderão estar implicadas no desenvolvimento de um fenótipo celular mais agressivo. Alguns autores sugerem que, no cancro de mama na mulher, a acumulação dos receptores Notch1 na membrana poderá decorrer da interacção desta via com os receptores de estrogénio (Yao *et al.* 2010; Rizzo *et al.* 2008). A presença de marcação citoplasmática nas células neoplásicas dos TMC estudados neste trabalho pode ser meramente indicativa da presença do receptor Notch não alterado, e não corresponder necessariamente a uma via aberrante de sinalização Notch, uma vez que é normal a presença do receptor inactivo no citoplasma. No entanto, a acumulação do receptor Notch1 no citoplasma poderá também decorrer de disfunções no tráfico intracelular desta molécula, associada a alterações de glicosilação. A enzima Pofut1 (O-fucosiltransferase) é responsável pela adição de resíduos de fucose ao receptor Notch1 imaturo no retículo endoplasmático, desempenhando uma função de *chaperone* que permite o transporte do receptor Notch1 para a membrana celular (Pannuti *et al.* 2010). Okamura e Saga (2008) detectaram que na ausência desta enzima em células embrionárias de ratinhos não ocorre o transporte do receptor Notch1 para a membrana celular, que se acumula no citoplasma. Alterações nesta enzima, ou enzimas semelhantes, poderão ser responsáveis pela acumulação do receptor Notch1 no citoplasma e desenvolvimento de neoplasia mamária (Pakkiriswami *et al.* 2016). As alterações de glicosilação das proteínas são características das células neoplásicas, do processo de oncogénese e metastização, tendo sido já descritas em tumores de mama na mulher e na cadela (Potapenko *et al.* 2010; Pinho *et al.* 2009).

Apesar de se manter a expressão citoplasmática do receptor Notch1 em todos os carcinomas, em 9 casos verificou-se uma diminuição na proporção de células marcadas, e em 16 casos verificou-se diminuição da percentagem de células marcadas e/ou intensidade de marcação (Fig. C, Anexo IV). Estes resultados parecem sugerir que em alguns tumores se observa desregulação do Notch1, que se traduz na diminuição da intensidade de marcação e/ou extensão de marcação. Assim a via de sinal Notch1 poderá estar implicada no processo de transformação neoplásica na glândula mamária de cadelas, embora não seja essencial.

Neste estudo verificou-se que, apesar de não haver uma associação estatisticamente significativa entre o grau histológico e a proporção de células neoplásicas marcadas com Notch1, parece haver uma tendência para tumores de elevado grau (II+III) e tumores com elevado pleomorfismo nuclear (2+3), apresentarem marcação de mais de 75% das células (Fig. E, Anexo III). De facto, em ambos os casos, o valor de p foi estatisticamente significativo ($p=0,014$ e $p=0,032$ respectivamente) mas, no entanto, o baixo número de casos não permitiu a utilização do teste do Qui-quadrado (X^2) de Fisher, pelo que estes resultados deverão ser encarados com alguma cautela. Esta limitação poderá ser ultrapassada num estudo posterior, através do aumento da casuística utilizada.

Alguns estudos descrevem uma relação directa e estatisticamente significativa entre o grau histológico dos tumores e expressão do receptor Notch1 no cancro de mama na mulher (Yao *et al.* 2011; Yuan *et al.* 2015). Zardawi e colaboradores (2010) detectaram também um aumento na expressão do receptor Notch1 com o aumento do grau nuclear de carcinoma ductal *in situ* na mulher, no entanto não detectaram uma associação estatisticamente significativa entre a expressão Notch1 e o grau tumoral. Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que o receptor Notch1 poderá desempenhar um papel na transformação neoplásica nos TMC, uma vez que a indiferenciação celular e pleomorfismo nuclear são considerados um marco da transformação e progressão maligna. O papel do receptor Notch1 em tumores de mama com comportamento biológico mais agressivo pode estar associado à sua acção na transição epitelial-mesenquimatosa e sobre as células estaminais neoplásicas. A associação entre o receptor Notch1 e estes fenómenos de progressão neoplásica já foi descrita no cancro de mama na mulher em estudos *in vitro* e *in vivo* por vários autores (Leong *et al.* 2007; Chen *et al.* 2010; Pannuti *et al.* 2010; Bolós *et al.* 2013; Espinoza *et al.* 2013; Zhang *et al.* 2014; Shao *et al.* 2015;). O processo de transição epitelial-mesenquimatosa e acção das células estaminais na progressão tumoral já foram descritos nos TMC (Pang *et al.* 2011), embora não existam estudos sobre a relação destes processos com a via de sinal Notch nesta espécie.

Conclusão e perspectivas futuras

Apesar da simplicidade da via sinal Notch, que carece de mensageiros secundários ou extensa cascata de intermediários, esta está envolvida num grande número de processos celulares e é altamente dependente do contexto onde se insere, dependendo do tecido onde se encontra e vias de sinal com as quais interage. A via de sinal Notch permite uma multiplicidade de estudos, pelos diferentes receptores e ligandos que a constituem, diversos processos em que participa, diversas vias de sinal com as quais se cruza e diferentes patologias onde está implicada.

O estudo dos receptores Notch nos TMC poderá ser uma via de investigação aliciante, uma vez que já foi comprovada a sua participação no processo oncogénico nos tumores de mama na mulher, ratinhos e nas gatas. Na continuação deste estudo seria muito importante o aumento do número de casos de TMC, para obtenção de resultados estatisticamente significativos. Uma vez demonstrada a presença do receptor Notch1 na glândula mamária normal e carcinomas simples de cadela, seria útil um segundo estudo com a utilização de um anticorpo específico para o NICD para verificar se a via de sinal Notch1 se encontra activada nos TMC. À semelhança do que vários investigadores desenvolveram para a mulher, ratinhos e gatas, seria interessante a realização de estudos de prognóstico em cadelas, com seguimento clínico minucioso dos pacientes em intervalos regulares, avaliação da presença/ausência de metastização, “overall survival” (intervalo de tempo desde o diagnóstico ou início de tratamento e morte ou eutanásia relacionada com o tumor) e “disease-free interval” (intervalo de tempo entre o diagnóstico pós-cirúrgico e recidiva ou aparecimento de metástase). A via de sinal Notch permite, pela sua complexidade de interacções, diversos caminhos de investigação nos TMC, pelo estudo dos seus diferentes receptores (Notch1-4), vários ligandos (Jagged1-2; DII-1,3,4), e pelo estudo das suas interacções com diversas vias de sinal oncogénicas (Hedgehog, Wnt, factores de crescimento, receptores de estrogénio, citocinas inflamatórias, mTOR, etc).

Este trabalho preliminar acerca da expressão imunohistoquímica do receptor Notch1 nos TMC sugere que o receptor Notch1 poderá desempenhar um papel no desenvolvimento normal da glândula mamária nesta espécie e que este poderá também estar implicado no processo de carcinogénese mamária na cadela.

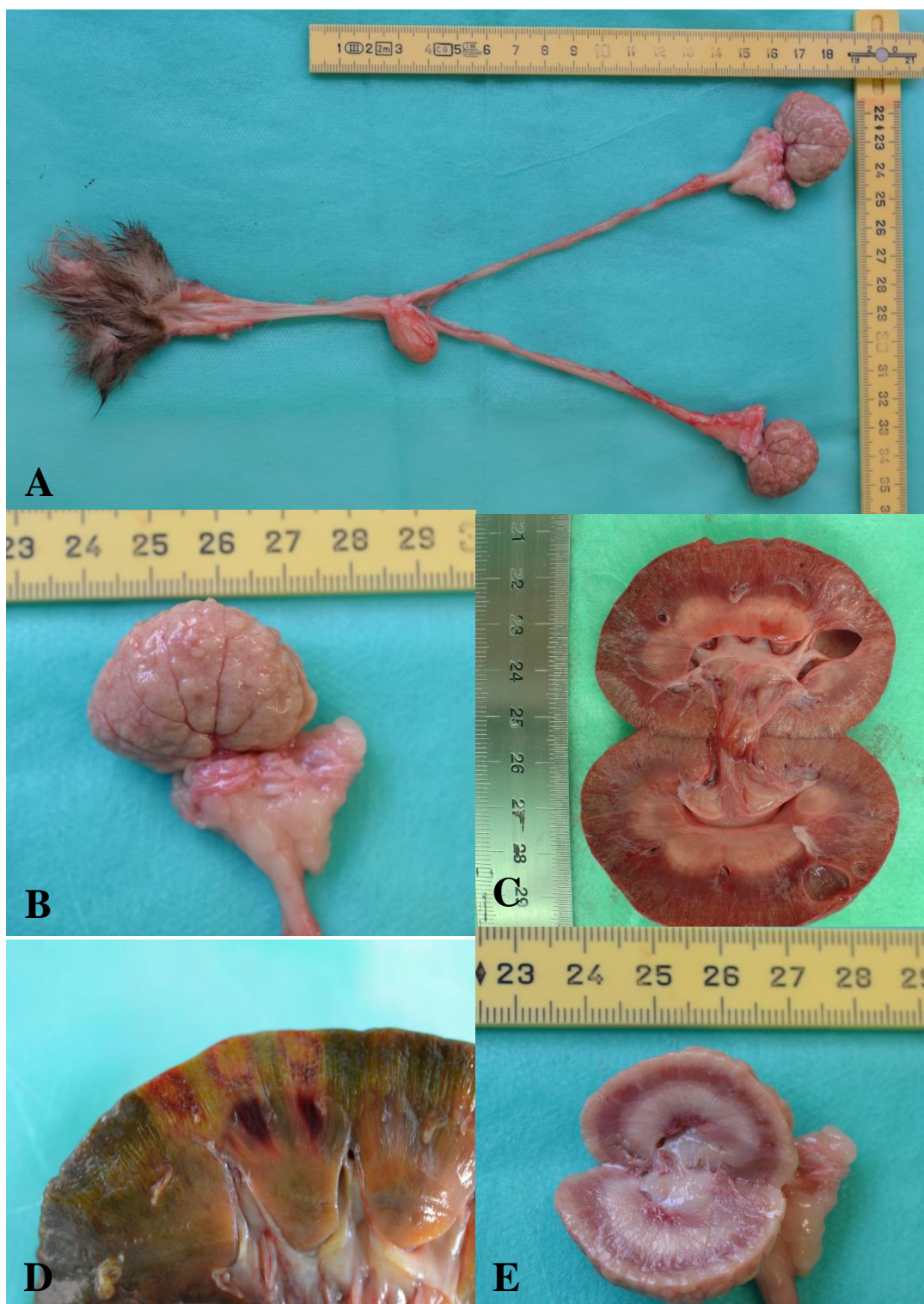
Bibliografia

- Alenza MDP, Peña L, del Castillo N, Nieto AI (2000) "Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours" **Journal of Small Animal Practice** 41, 287-291
- Bolós V, Mira E, Martínez-Poveda B, Luxán G, Cañamero M, Martínez-A C, Mañes S, la Pompa JL (2013) "Notch activation stimulates migration of breast cancer cells and promotes tumor growth" **Breast Cancer Research** 15:R54
- Brown CA, Elliott J, Schmiedt CW, Brown SA (2016) "Chronic Kidney Disease in Aged Cats: Clinical Features, Morphology, and Proposed Pathogenesis" **Veterinary Pathology** 53(2), 309-326
- Cao YW, Li WQ, Wan G, Li YX, Du XM, Li YC, Li F (2014) "Correlation and prognostic value of SIRT1 and Notch1 signaling in breast cancer" **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research** 33:97
- Chakrabarti S, Syme HM, Brown CA, Elliott J (2012) "Histomorphometry of Feline Chronic Kidney Disease and Correlation With Markers of Renal Dysfunction" **Veterinary Pathology** 50(1) 147-155
- Chen J, Imanaka N, Chen J, Griffin JD (2010) "Hypoxia potentiates Notch signaling in breast cancer leading to decreased E-cadherin expression and increased cell migration and invasion" **British Journal of Cancer** 102, 351-360
- Chew DJ, Dibartola S, Schenck P (2009) "Canine and Feline Nephrology and Urology" 2ª Edição, Elsevier Saunders, Missouri
- Cianciolo RE, Benali SL, Aresu L (2016) "Aging in the Canine Kidney" **Veterinary Pathology** 53(2), 299-308
- Cianciolo RE, Mohr FC, Aresu L, Brown CA, James C, Jansen JH, Spangler WL, van der Lugt JJ, Kass PH, Brovida C, Cowgill LD, Heiene R, Polzin DJ, Syme H, Vaden SL, van Dongen AM, Lees GE (2016) "World Small Animal Veterinary Association Renal Pathology Initiative: Classification of Glomerular Diseases in Dogs" **Veterinary Pathology** 53(1) 113-135
- Daudon M, Frochot V (2015) "Crystalluria" **Clin Chem Lab Med** 53, S1479-S1487
- Elston EW, Ellis IO (1993) "Method for grading breast cancer" **J Clin Pathol** 46, 189-190
- Espinoza I, Miele L (2013) "Notch inhibitors for cancer treatment" **Pharmacology & Therapeutics** 139, 95-110
- Espinoza I, Pochampally R, Xing F, Miele L (2013) "Notch Signalling: targeting cancer stem cells and epithelial-to-mesenchymal transition" **OncoTargets and Therapy** 6, 1249-1259
- Fortini ME (2009) "Notch Signaling: The Core Pathway and Its Posttranslational Regulation" **Developmental Cell** 16
- Frazier KS, Seely JC, Hard GC, Betton G, Burnett R, Nakatsuji S, Nishikawa A, Durchfeld-Meyer B, Bube A (2012) "Proliferative and Nonproliferative Lesions of the Rat and Mouse Urinary System" **Toxicologic Pathology** 40, 14S-86S
- Goldschmidt M, Peña L, Rasotto R, Zapulli V "Classification and Grading of Canine Mammary Tumors" **Veterinary Pathology** 48(I), 117-131
- Guo S, Liu M, Gonzalez-Perez RR (2011) "Role of Notch and its oncogenic signaling crosstalk in breast cancer" **Biochimica et Biophysica Acta** 1815, 197-213
- Ito S, Kobayashib A, Tsuchiya T, Moriyama Y, Kikuchi M, Deguchi T, Yamaguchi Y (2009) "Thyroidization in renal allografts" **Clinical Transplant** 23, 6-9
- Jennette JC, Olson JL, Schwartz MM, Silva FG (2007) "Heptinstall's Pathology of the kidney", 6th edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
- Jubb, Kennedy, Palmers (2015) "Pathology of Domestic Animals Volume 2" 6ª edição, Saunders Ltd.
- Khan SR (2006) "Renal tubular damage/dysfunction: key to the formation of kidney stones" **Urol Res** 34, 86-91
- Kristiansen VM, Peña L, Díez Córdova L, Illera JC, Skjerve E, Breen AM, Cofone MA, Langeland M, Teige J, Goldschmidt M, Soremno KU (2016) "Effect of Ovariectomy at the Time of Tumor Removal in Dogs with Mammary Carcinomas: A randomized Controlled Trial" **J Vet Intern Med** 6, 230-241
- Leong KG, Niessen K, Kulic I, Raouf A, Eaves C, Pollet I, Karsan A (2007) "Jagged1-mediated Notch activation induces epithelial-to-mesenchymal transition through Slug-induced repression of E-cadherin" **The Journal of Experimental Medicine** Vol. 204, Nº12, 2935-2948

- Ma D, Dong X, Zang S, Ma R, Zhao P, Guo D, Dai J, Chen F, Ye J, Ji C (2011) "Aberrant expression and clinical correlation of Notch signaling molecules in breast cancer of Chinese population" **Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology** 7, 385-391
- McLeland SM, Cianciolo RE, Duncan CG, Quimby J M (2015) "A Comparison of Biochemical and Histopathologic Staging in Cats With Chronic Kidney Disease" **Veterinary Pathology** 52(3), 524-534
- Menè P, Polci R, Festucci F (2003) "Mechanisms of repair after kidney injury" **J Nephrology** 16, 186-185
- Misdorp W, Else RW, Hellmén E, Lipscomb TP (1999) "Histological Classification of Mammary Tumors of the Dog and the Cat" **Armed Forces Institute of Pathology**, Washington, D.C, 11-58
- Mittal S, Sharma A, Balaji SA, Gowda MC, Dighe RR, Kumar RV, Rangarajan A (2014) "Coordinate Hyperactivation of Notch1 and Ras/MAPK Pathways Correlates with Poor Patient Survival: Novel Therapeutic Strategy for Aggressive Breast Cancers" **Mol Cancer Ther**; 13(12)
- Mungamuri SK, Yang X, Thor AD, Somasundaram K (2006) "Survival Signaling by Notch1: Mammalian Target of Rapamycin (mTOR)-Dependent Inhibition of p53" **Cancer Res** 66(9)
- Okamura Y, Saga Y (2008) "Pofut1 is required for the proper localization of the Notch receptor during mouse development" **Mechanisms of Development** 125, 663-673
- Pakkiriswami S, Couto A, Nagarajan U, Georgiou M (2016) "Glycosylated Notch and Cancer" **Front. Oncol.** 6:37
- Pang LY, Cervantes-Arias A, Else RW, Argyle DJ (2011) "Canine Mammary Cancer Stem Cells are Radio- and ChemoResistant and Exhibit an Epithelial-Mesenchymal Transition Phenotype" **Cancers** 3, 1744-1762
- Pannuti A, Foreman K, Rizzo P, Osipo C, Golde T, Osborne B, Miele L (2010) "Targeting Notch to Target Cancer Stem Cells" **Clin Cancer Res** 16(12) 3141-52
- Paryan M, Tavaloki R, Mohammad S, Rad AH, Feizi N, Kamani F, Mostafavi E, Mohammadi-Yeganeh S (2016) "Over-expression of NOTCH1 as a biomarker for invasive breast ductal carcinoma" **Biotech** 6:58
- Peña L, Gama A, Goldschmidt MH, Abadie J, Benazzi C, Castagnaro M, Díez L, Gartner F, Hellmén E, Kiupel M, Millán Y, Miller MA, Nguyen F, Poli A, Sarli G, Zappulli V, Martín de las Mulas J (2014) "Canine Mammary Tumors: A review and Consensus of Standard Guidelines on Epithelial and Myoepithelial Phenotype Markers, HER2, and Hormone Receptor Assessment Using Immunohistochemistry" **Veterinary Pathology** 51(I), 127-14
- Pinho SS, Carvalho S, Cabral J, Reis CA, Gartner F (2012) "Canine tumours: a spontaneous animal model of human carcinogenesis" **Translational Research** Volume 159, Number 3
- Pinho SS, Osório H, Nita-Lazar M, Gomes J, Lopes C, Gartner F, Reis CA (2009) "Role of E-cadherin N-glycosylation profile in a mammary tumor model" **Biochemical and Biophysical Research Communications** 379, 1091-1096
- Pires MA, Travassos FS, Gartner F (2004) "Atlas de Patologia Veterinária" LIDEL, Edições Técnicas, Lda
- Potapenko IO, Haakensen VD, Luders T, Helland A, Bukholm I, Sorlie T, Kristensen VN, Lingjörð OC, Borresen-Dale A (2010) "Glycan gene expression signatures in normal and malignant breast tissue; possible role in diagnosis and progression" **Molecular Oncology** 4, 98-118
- Queiroga FL, Raposo T, Carvalho MI, Prada J, Pires I (2011) "Canine Mammary Tumours as a Model to Study Human Breast Cancer: Most recent findings" **in vivo** 25, 455-466
- Reedijk M, Odorcic S, Chang L, Zhang H, Miller N, McCready DR, Lockwood G, Egan SE (2005) "High-level Coexpression of JAG1 and NOTCH1 is Observed in Human Breast Cancer and Is Associated with Poor Overall Survival" **Cancer Res** 65:(18)
- Rehman AO, Wang C (2006) "Notch Signalling in the regulation of tumor angiogenesis" **TRENDS in Cell Biology** 16,
- Ressel L, Else RW, Poli A, Argyle DJ (2014) "Aberrant Subcellular Immunolocalization of Notch-1 Activated Intracellular Domain in Feline Mammary Tumours" **J. Com. Path** 150, 366-372
- Rizzo P, Miao H, D'Souza G, Osipo C, Yun J, Zhao H, Mascarenhas J, Wyatt D, Antico G, Hao L, Yao K, Rajan P, Hicks C, Siziopikou K, Selvaggi S, Bashir A, Bhandari D, Marchese A, Lendahl U, Quin J, Tonetti DA, Albain K, Nickoloff BJ, Miele L (2008) "Cross-talk between Notch and the Estrogen Receptor in Breast Cancer Suggests Novel Therapeutic Approaches" **Cancer Res.** 68(13), 5226-5235
- Salas Y, Márquez A, Diaz D, Romero L (2015) "Epidemiological Study of Mammary Tumors in Female Dogs Diagnosed during the Period 2002-2012: A Growing Animal Health Problem" **PLoS ONE** 10(5), e0127381

- Santos M, Marcos R, Faustino AMR (2010) "Histological Study of Canine Mammary Gland During the Oestrous Cycle" **Reprod Dom Anim** 45, e146-e154
- Schmiedt CW, Brainard BM, Hinson W, Brown SA, Brown CA (2016) "Unilateral Renal Ischemia as a Model of Acute Kidney Injury and Renal Fibrosis in Cats" **Veterinary Pathology** 53(1), 87-101
- Segev G, Cowgill LD, Jessen S, Berkowitz A, Mohr CF, Aroch I (2012) "Renal Amyloidosis in Dogs: A Retrospective Study of 91 Cases with Comparison of the Disease between Shar-Pei and Non-Shar-Pei Dogs" **J Vet Intern Med** 26, 259-268
- Shao S, Zhao X, Zhang X, Luo M, Zuo X, Huang S, Wang Y (2015) "Notch1 signaling regulates the epithelial-mesenchymal transition and invasion of breast cancer in a Slug-dependent manner" **Molecular Cancer** 14:28
- Shtrasburg S, Gal R, Gruys E, Perl S, Martin BM, Kaplan B, Koren R, Nyska A, Pras M, Livneh A (2005) "An Ancillary Tool for the Diagnosis of Amyloid A Amyloidosis in a Variety of Domestic and Wild Animals" **Vet Pathol** 42, 132-139
- Sleeckx N, Rooster H, Veldhuis Kroeze EBJ, Van Ginneken C, Van Brantegem L (2011) "Canine Mammary Tumours, na Overview" **Reproduction in Domestic Animals** 46, 1112-1131
- Soremno K U, Rasotto R, Zapulli V, Goldschmidt M H (2011) "Development, Anatomy, Histology, Lymphatic Drainage, Clinical Features, and Cell Differentiation Markers of Canine Mammary Gland Neoplasms" **Veterinary Pathology** 48, 85-97
- Stylianou S, Clarke RB, Brennan K (2006) "Aberrant Activation of Notch Signaling in Human Breast Cancer" **Cancer Res** 66(3)
- Takahashi M, Morita T, Sawada M, Uemura T, Haruna A, Shimada A (2005) "Glomerulocystic Kidney in a Domestic Dog" **J. Comp. Path.** 133, 205-208
- Toupikioti P, Chondronasiou D, Ziouti F, Koubanaki M, Haitoglou K, Kouvatseas G, Papazisis KT (2012) "Expression of Notch Receptors in Primary Breast Cancer and Correlation with Pathological Features" **Clin Exp Pharmacol** 2:109
- Tsuchiya Y, Yabe K, Takada S, Shii Y, Jindo T, Furuhashi K, Suzuki K T (2005) "Early Pathophysiological Features in Canine Renal Papillary Necrosis Induced by Nefiracetam" **Toxicologic Pathology** 33, 561-569
- Vaden SL (2011) "Glomerular Disease" **Topics in Companion Animal Medicine**, Volume 26, Issue 3, 128-134
- Vascellari M, Capello K, Carminato A, Zanardello C, Baioni E, Mutinelli F (2016) "Incidence of mammary tumors in the canine population living in the Veneto region (Northeastern Italy): Risk factors and similarities to human breast cancer" **Preventive Veterinary Medicine** 126, 183-189
- Yao K, Rizzo P, Rajan P, Albain K, Rychlik K, Shah S, Miele L (2011) "Notch-1 and Notch-4 Receptors as Prognostic Markers in Breast Cancer" **International Journal of Surgical Pathology** 19(5), 607-613
- Yin L, Velazquez OC, Liu Z (2010) "Notch Signalling: Emerging molecular targets for cancer therapy" **Biochemical Pharmacology** 80, 690-701
- Yuan X, Zhang M, Wu H, Xu H, Han N, Chu Q, Yu S, Chen Y, Wu K (2015) "Expression of Notch1 Correlates with Breast Cancer Progression and Prognosis" **PLoS ONE** 10(6)
- Zachary J F, McGavin M D (2012) "Pathologic Basis of Veterinary Disease" 6ª edição, Elsevier Mosby, Missouri
- Zang A, Ji CH, QU X, Dong X, Ma D, Ye J, Ma R, Dai J, Guo D (2007) "A study on notch signaling in human breast cancer" **Neoplasma** 54,4
- Zardawi SJ, Zardawi I, McNeil CM, Millar EKA, Mcleod D, Morey AL, Crea P, Murphy NC, Pinese M, Lopez-Knowles E, Oakes SR, Ormandy CJ, Qiu MR, Hamilton A, Spillane A, Lee CS, Sutherland RL, Musgrove EA, O'Toole SA (2010) "High Notch1 protein expressions is na early event in breast cancer development and is associated with the HER-2 molecular subtype" **Histopathology** 56, 286-296
- Zhang X, Zhao X, Shao S, Zuo X, Ning Q, Luo M, Gu S, Zhao X (2015) "Notch1 induces epithelial-mesenchymal transition and the cancer stem cell phenotype in breast cancer cells and STAT3 plays a key role" **International Journal of Oncology** 46, 1141-1148
- Zhou W, Wang G, Guo S (2013) "Regulation of angiogenesis via Notch signaling in breast cancer and cancer stem cells" **Biochimica et Biophysica Acta** 1836, 304-320

Anexo I – Alterações Renais Macroscópicas



Alterações Renais Macroscópicas. Fig A: Atrofia renal unilateral, Gato; Fig B: Massas proeminentes de distribuição difusa, Gato; Fig C: Quistos renais, Cão; Fig D: Enfartes renais, Cão; Fig E: Necrose da crista medular, Gato.

Anexo II – Lesões Não Renais Associadas à Urémia



Alterações Não Renais Associadas à Urémia. Fig. A: Calcificação dos espaços intercostais, Cão; Fig. B: Úlceras na base da língua, Cão; Fig. C: Mineralização da mucosa traqueal, Gato.

Anexo III – Alterações Renais Histopatológicas

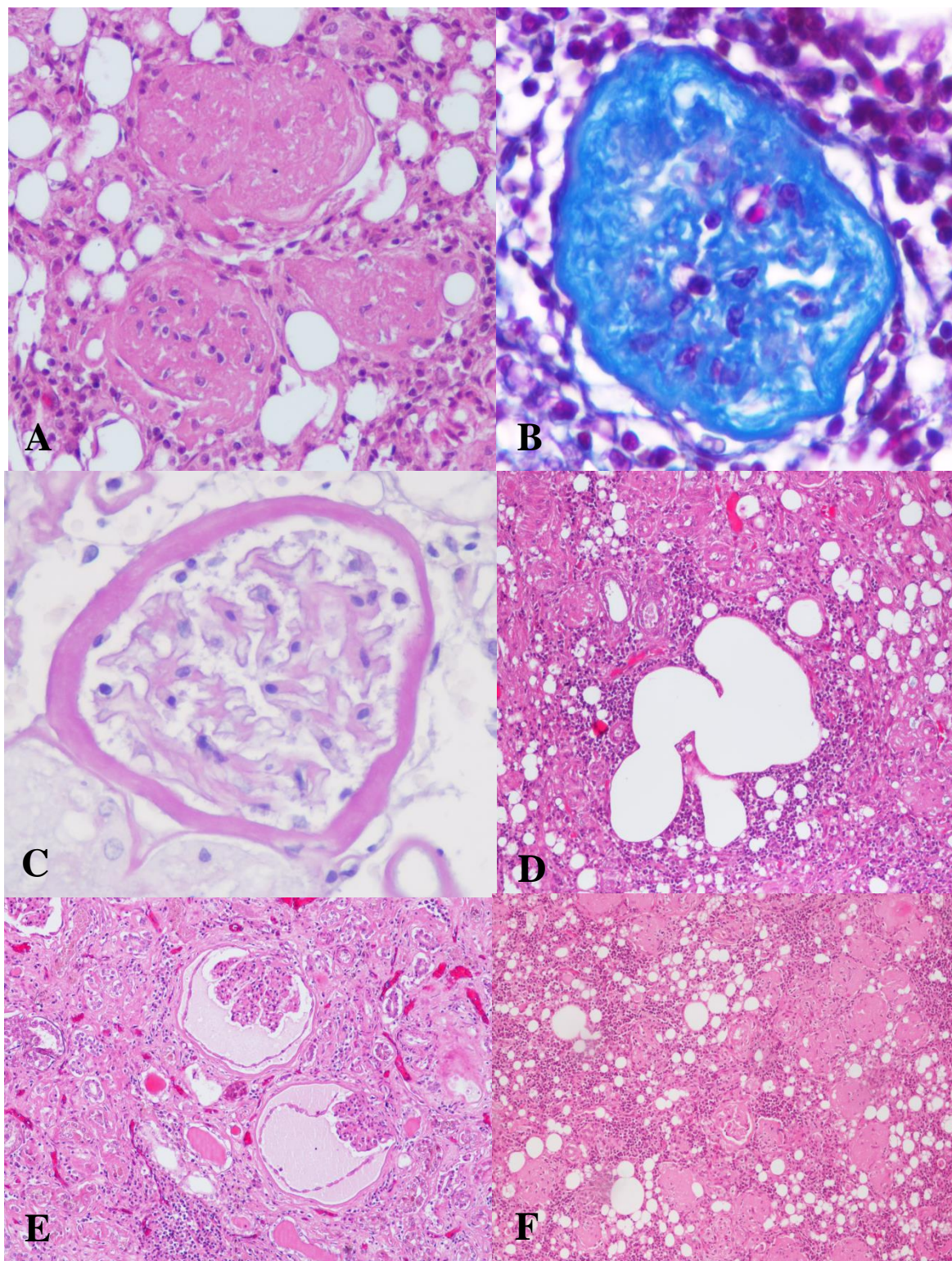


Fig A- Obsolescência glomerular, HE, 200x, Gato; Fig B- Obsolescência glomerular, TM, 600x, Gato; Fig C-Espessamento da cápsula de Bowman, PAS, 400x, Gato; Fig D-Quisto renal, HE, 100x, Gato; Fig E- Doença glomeruloquística, HE, 100x, Gato; Fig. F- Infiltrado inflamatório mononuclear difuso, HE, 100x, Gato.

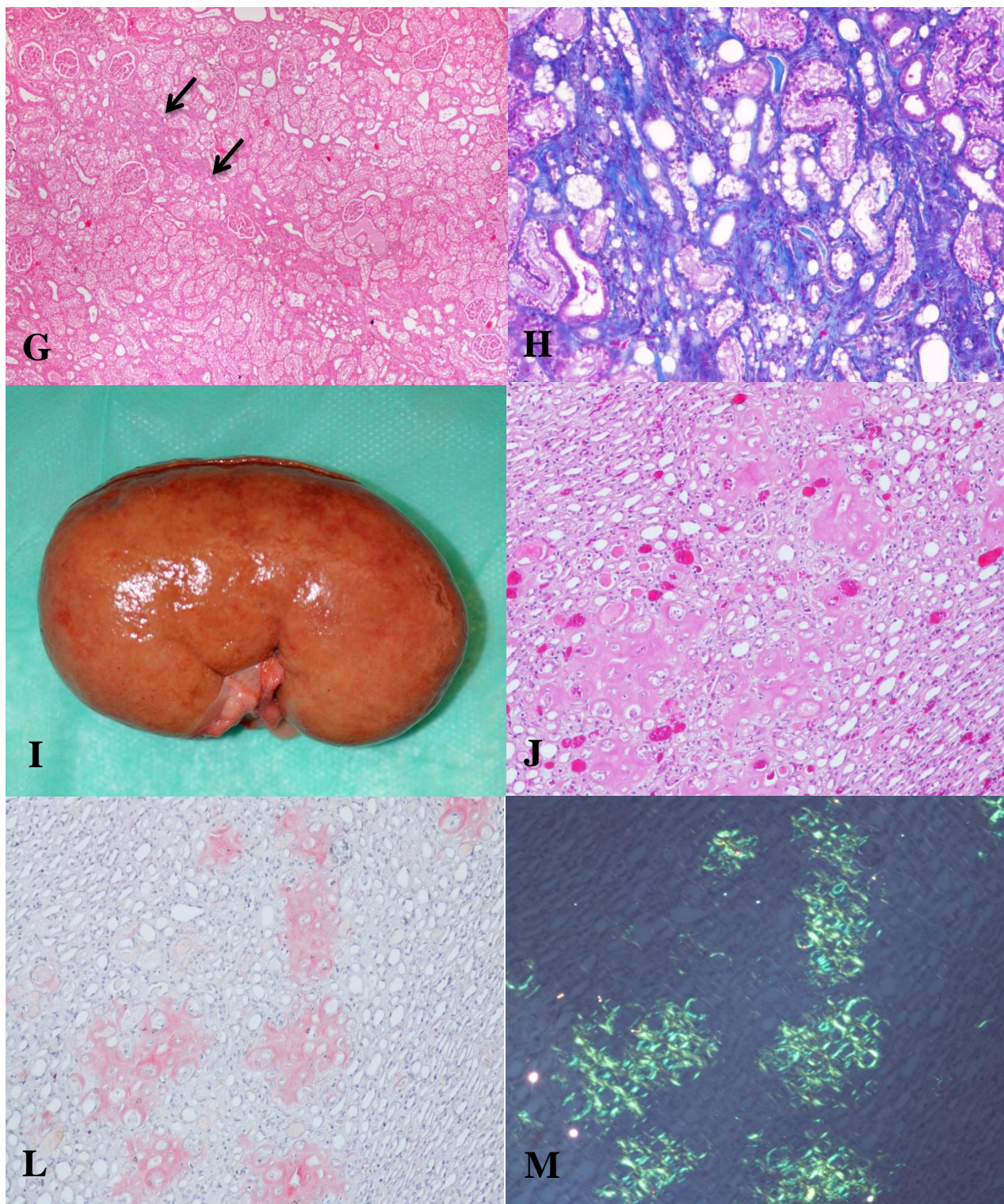


Fig. G- Fibrose intersticial (setas), HE, 40x, Gato; Fig. H- Fibrose intersticial, TM, 100x, Gato; Fig. I- Amiloidose renal, Cão; Fig. J- Amiloidose medular, HE, 100x, Gato; Fig. L- Amiloidose medular, Vermelho do Congo, 100x, Gato; Fig. M- Amiloidose medular, refringência esverdeada à luz polarizada, 100x, Gato.

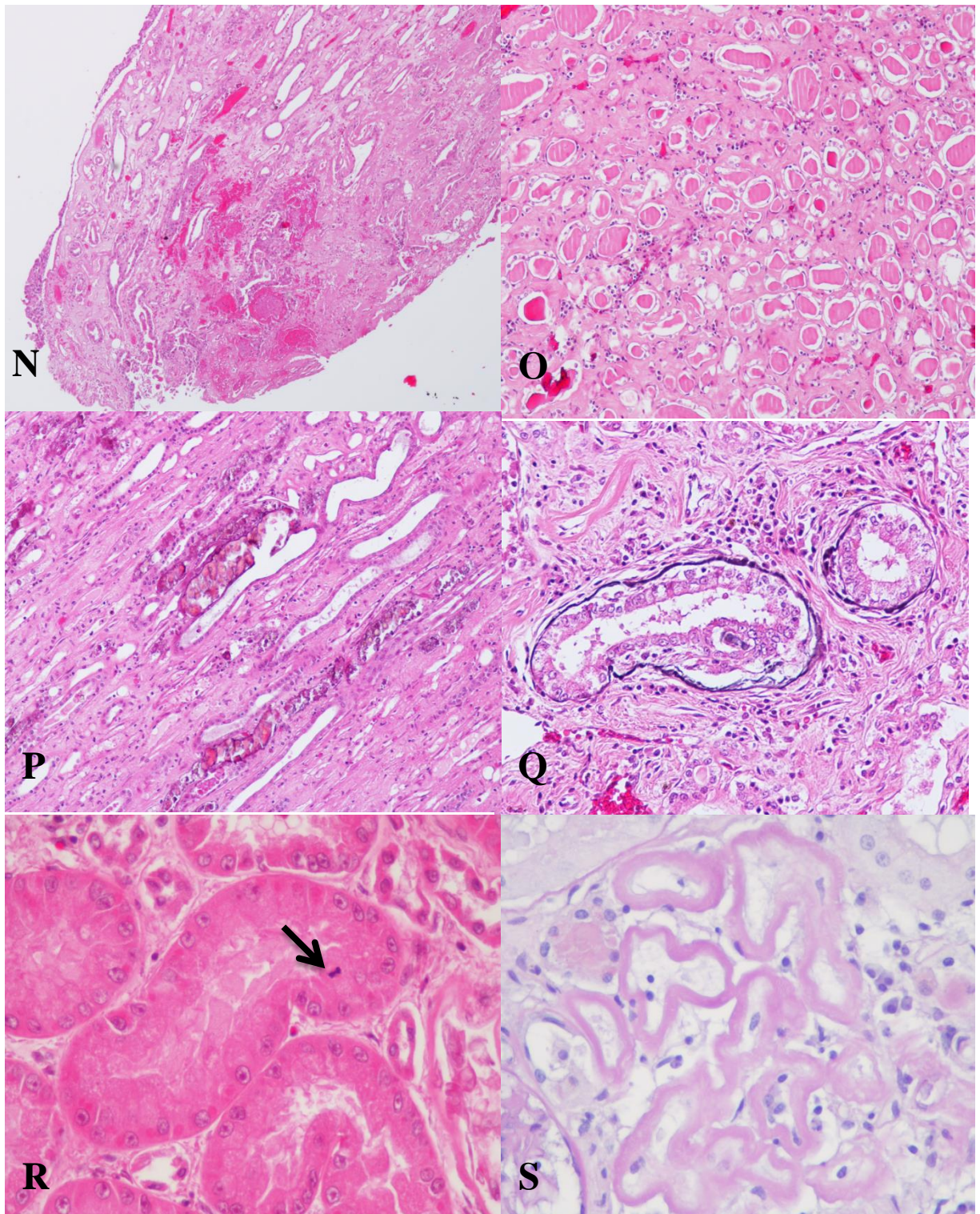


Fig. N- Necrose da crista medular, HE, 40x, Gato; Fig. O- Tiroidinização, HE, 100x, Cão; Fig. P- Cristalúria, HE, 100x, Gato; Fig. Q- Calcificação da membrana basal tubular, HE, 200x, Cão; Fig. R- Regeneração tubular evidenciando figura de mitose (seta), HE, 400x, Gato; Fig. S- Atrofia tubular, PAS, 400x, Gato.

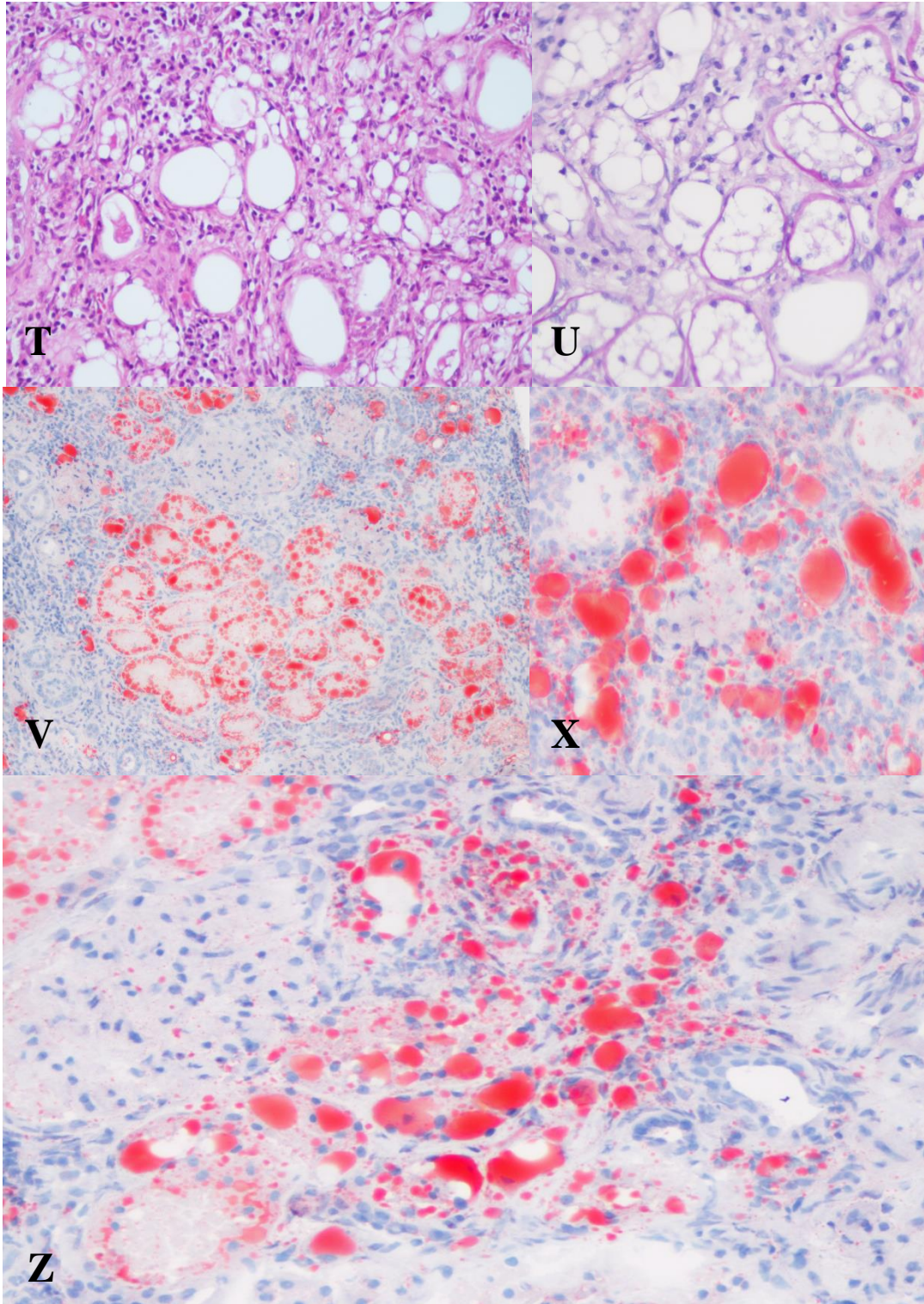


Fig T- Lípidos intratubulares e intersticiais; HE, 200x, Gato; Fig. U- Lípidos intratubulares e intersticiais, PAS, 200x, Gato; Fig.V- Lípidos intratubulares, Oil Red (corte de congelção), 100x, Gato; Fig. X- Lípidos intersticiais, Oil Red (corte de congelção), 200x, Gato; Fig.Z- Lípidos intratubulares e intersticiais, Oild Red (corte de congelção), 200x, Gato.

Anexo IV – Expressão imunohistoquímica do receptor Notch1

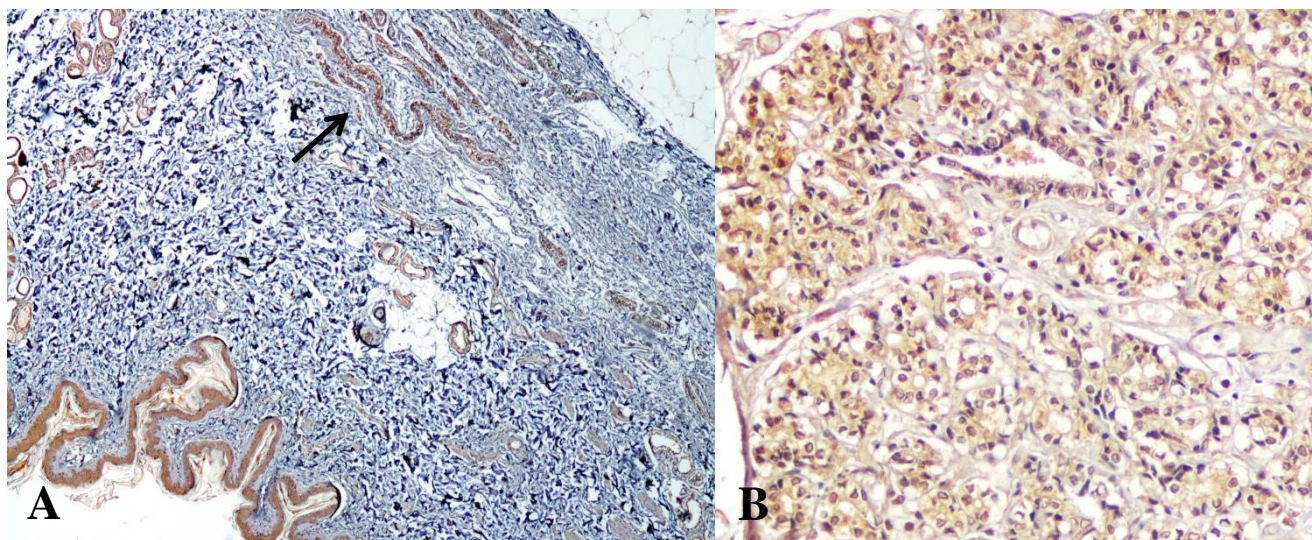


Figura A – Glândula mamária normal, 40x. Note-se a imunomarcagem do Notch1 na epiderme, folículos pilosos e glândula mamária (seta). Figura B – Glândula mamária normal com imunomarcagem citoplasmática de Notch1 em mais de 75% das células epiteliais luminais, 100x.

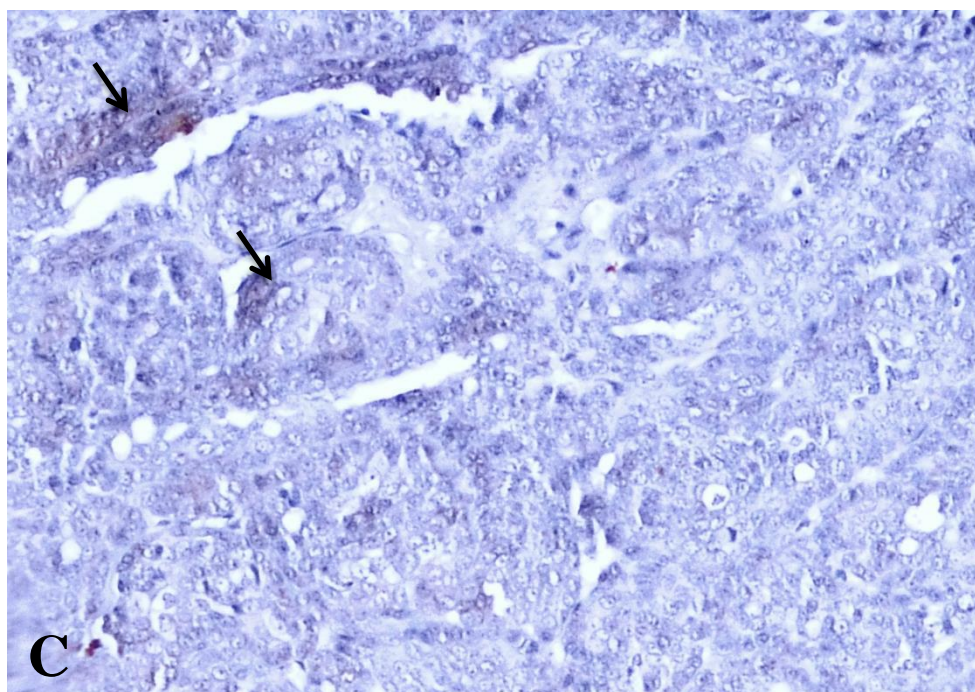


Figura C – Carcinoma sólido evidenciando discreta imunomarcagem de reduzido número de células epiteliais luminais (setas), 100x.

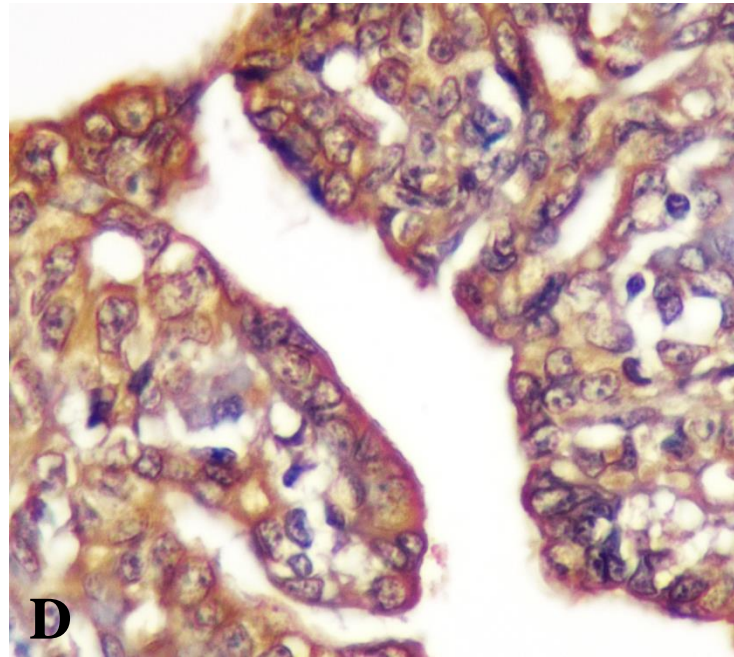


Figura D – Carcinoma Tubulopapilar evidenciando reforço de imunomarcção do anticorpo anti-Notch1 na membrana apical das células epiteliais luminais, 400x.

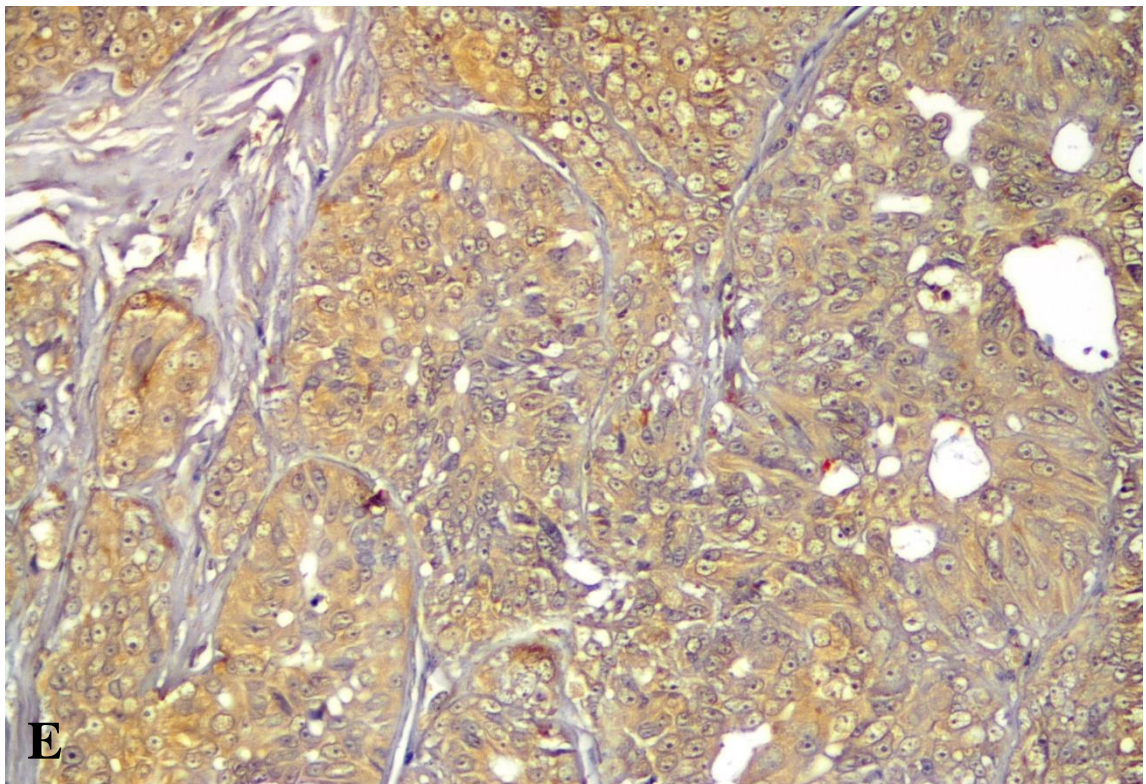


Figura E – Carcinoma sólido pouco diferenciado de elevado pleomorfismo nuclear evidenciando imunomarcção citoplasmática intensa de mais de 75% das células epiteliais luminais, 200x.